

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



Bc. Romana, Čuperková

Optimalizace postupů pro kvantifikaci miRNA z tenkojehlových bioptických vzorků
karcinomu pankreatu.

Optimization of miRNA analysis in fine-needle biopsy samples of pancreatic cancer
tissue.

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Lucie Benešová, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13.08.2014

Podpis

Poděkování:

Děkuji především své školitelce RNDr. Lucii Benešové, Ph.D. za odborné vedení, zasvěcení do problematiky a ochotu pomoci mi nejen s touto prací, ale také po celou dobu mého magisterského studia. Děkuji paní doktorce Benešové a RNDr. Marku Minárikovi, Ph.D. za možnost pracovat ve společnosti Genomac International s.r.o., kde jsem se naučila nespočet metod přesahujících rámec této práce a kde jsem na vlastní kůži mohla pocítit, jakým způsobem funguje soukromý sektor v oblasti genomické analýzy. Mé díky patří také Mgr. Tereze Hálkové, která mi pomohla naměřit cenná data a všem ostatním kolegům ze společnosti Genomac, kteří vytvářeli příjemné pracovní prostředí a byli ochotni kdykoli pomoci. Dále bych chtěla poděkovat lékařům z Interní kliniky Ústřední vojenské nemocnice - MUDr. Bohušovi Bunganičovi, MUDr. Tereze Dvořákové a prof. MUDr. Miroslav Zavoralovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků EUS-FNB. V neposlední řadě děkuji svému příteli, rodině a přátelům, kteří mi byli po celou dobu studia oporou.

Práce byla podporována grantem IGA MZČR NT13638.

Abstrakt:

Karcinom pankreatu (KP) je velmi závažné onemocnění s pětiletým přežitím menším než 5 %. V současné době neexistuje žádný spolehlivý nástroj pro diagnózu KP v jeho časných stádiích. Pacienti v době diagnózy tak bývají často v pokročilém stádiu onemocnění a léčba nemívá výrazný účinek. Z těchto důvodů se klade stále větší důraz na nalezení vhodných molekulárních znaků, a to zejména pro zlepšení diagnózy a odhad prognózy. Jedním z takových nadějných znaků jsou miRNA. Jejich analýza v tkáni pankreatu je ale složitý proces. Hlavním důvodem je velmi malé množství vzorku získaného tenkojehlovou biopsií a dále pak samotný charakter pankreatické tkáně, ze které bývá úspěšnost molekulárně-genetických vyšetření výrazně nižší v porovnání s ostatními tkáněmi. Dalším negativním faktorem je značná heterogenita tkáně, díky které se zastoupení nádorových buněk v různých částech vzorku často liší. A tak vhodná volba postupu izolace nukleových kyselin (NK) a následných analýz včetně kvantifikace nádorových buněk ve vzorku je pro správné stanovení hladin miRNA zcela klíčová.

Tato práce je zaměřená na optimalizaci celého postupu stanovení hladin miRNA z biotických vzorků pankreatické tkáně zahrnující izolaci NK, kvantifikaci nádorových buněk pomocí stanovení mutací v genu KRAS, syntézu cDNA a analýzu hladin vybraných miRNA metodou qPCR. Dílčí kroky byly hodnoceny na základě množství získaných NK a výtěžku a kvality PCR produktů amplifikovaných z DNA a cDNA templátů. Funkčnost celého postupu pak byla ověřena analýzou genu KRAS, dvou miRNA (miR-21 a miR-10b) a referenčního genu RNU6b na souboru 110 biotických vzorků s úspěšností 100 % (KRAS a miR-21), 99 % (RNU6b) a 93 % (miR-10b). Podařilo se tedy vyvinout a ověřit účinný postup pro rutinní kvantifikaci miRNA z biotických vzorků tkáně pankreatu.

Klíčová slova:

Karcinom pankreatu, EUS-FNB, biopsie tenkou jehlou, miRNA, optimalizace, chronická pankreatitida, izolace RNA, izolace DNA, qRT-PCR, heteroduplexní analýza, KRAS, diagnostika, prognóza.

Abstract:

Pancreatic cancer (PC) is extremely severe malignant disease with a five-year survival of less than 5%. Currently there is no reliable tool for the diagnosis of PC in its early stages. At the time of clinical symptoms most patients are in an advanced stage of the disease and the treatment does not usually have a significant effect. For these reasons emphasis is gradually shifting to the search for the suitable molecular markers for improvement of the diagnosis and assessment of the survival prognosis with respect to a possibility of surgical treatment. MiRNA represent one of the most promising markers, although, their examination in pancreatic tissue is a complicated process. One of the reasons is the very small amount of the source material coming from a fine needle biopsy. A second cause of problems is the subtle character of the pancreatic tissue resulting in significantly lower yields of molecular genetic analysis when compared to other epithelial tissues. An additional negative factor is heterogeneity of the tissue resulting in disproportionate representation of tumor cells within the sample. A suitable choice of procedures for isolation of nucleic acids (NA) and subsequent analysis including quantification of tumor cells is critical for accurate evaluation of the miRNA levels.

This work is focused on optimization of the entire process from the initial acquisition of the sample from pancreatic tissue biopsy and isolation of NA, tumor cells quantification based on mutation detection in *KRAS* gene, cDNA synthesis and, finally, measurement of levels of selected miRNAs by qPCR. The partial steps were evaluated based on the quantities of nucleic acids and the yield and quality of the PCR products amplified from DNA and cDNA templates. The efficiency of the complete procedure was verified by a successful analysis of the *KRAS* gene, two miRNAs (miR-21 and miR-10b) and a reference gene *RNU6b* on a set of 110 biopsy samples with a success rate of 100% (*KRAS* and miR-21), 99% (*RNU6b*) and 93% (miR-10b). This confirmed a successful development and validation of an efficient procedure for reliable quantification of miRNAs from biopsy tissue samples of the pancreas applicable in routine clinical practice.

Keywords:

Pancreatic cancer, EUS-FNB, fine needle biopsy, miRNA, optimization, chronic pancreatitis, RNA isolation, DNA isolation, qRT-PCR, heteroduplex analysis, *KRAS*, diagnostics, prognosis.

Obsah:

1 ÚVOD	9
2 PŘEHLED LITERATURY	11
2.1 MiRNA	11
2.1.1 Obecná charakteristika a historie objevu miRNA	11
2.1.2 Geny pro miRNA	12
2.1.3 Biogeneze miRNA	12
2.1.4 Variabilita miRNA	14
2.1.5 Regulační funkce miRNA	15
2.1.6 Degradace miRNA	16
2.1.7 MiRNA a nádorová onemocnění	16
2.2 Karcinom pankreatu	18
2.2.1 Epidemiologie a prognóza karcinomu pankreatu	18
2.2.2 Klasifikace karcinomů pankreatu	19
2.2.3 Molekulární podstata karcinomu pankreatu	21
2.2.4 Rizikové faktory vzniku karcinomu pankreatu	22
2.2.5 Diagnostika a léčba karcinomu pankreatu	23
2.3 MiRNA a karcinom pankreatu	24
2.3.1 MiRNA ovlivňující důležité procesy maligní transformace tkáně pankreatu	24
2.3.2 Diagnostika karcinomu pankreatu pomocí miRNA	26
2.3.3 Vliv miRNA na účinek léčby a možnosti terapie	29
2.4 Metody detekce exprese miRNA u karcinomu pankreatu	30
2.4.1 Problematika EUS-FNB	32
2.5 Vyšetřované molekulární znaky	35
2.5.1 MiR-21-5p	35
2.5.2 MiR-10b-5p	36
2.5.3 Referenční gen U6 (RNU6b)	36
2.5.4 Gen <i>KRAS</i>	37
3 CÍLE PRÁCE	40
4 MATERIÁL A METODIKA	41
4.1 Pacienti	41
4.2 Odběr a uchovávání vzorků	41
4.3 Izolace RNA	42
4.3.1 Izolace celkové RNA soupravou RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit	42
4.3.2 Izolace RNA v rámci optimalizačních kroků	43
4.4 Izolace DNA	46
4.5 Horizontální gelová elektroforéza v agarózovém gelu	47
4.6 PCR	48
4.6.1 PCR amplifikace genu <i>KRAS</i> (exon 2)	48
4.6.2 PCR amplifikace genů <i>GA733-2</i> , <i>CEA</i> , <i>EGFR</i> a <i>ACTB</i>	49
4.7 Reverzní transkripce	50
4.7.1 Reverzní transkripce maturovaných miRNA a malých RNA soupravou qScript microRNA cDNASynthesis Kit	50
4.7.2 Reverzní transkripce v rámci optimalizačních kroků	52

4.8 qPCR.....	53
4.8.1 qPCR soupravou PerfeCTa microRNA Assay	54
4.8.2 qPCR v rámci optimalizačních kroků	55
4.9 Heteroduplexní analýza genu <i>KRAS</i> pomocí DCE	56
5 VÝSLEDKY	58
5.1 Organizace postupů	58
5.2 Vývoj postupů	59
5.2.1 Optimalizace izolace NK.....	59
5.2.2 Optimalizace RT.....	62
5.2.3 Optimalizace qPCR	64
5.2.4 Návrh výpočtu expresí miRNA s ohledem na množství nádorových buněk ve vzorku....	72
5.3 Analýzy klinických vzorků.....	73
5.3.1 Ověření laboratorního postupu pro izolaci NK	73
5.3.2 Analýza mutací v genu <i>KRAS</i>	75
5.3.3 Ověření laboratorního postupu pro qRT-PCR.....	77
6 DISKUZE.....	80
7 SOUHRN.....	87
8 PŘEHLED LITERATURY	88

Abstrakt k posteru ze XVII. celostátní konference DNA diagnostiky

Seznam zkratek:

ACTB	gen pro aktin, <i>ACTin Beta</i>
ADAR	enzym editující miRNA, <i>Adenosine Deaminase that Acts on RNA</i>
CEA	tumorový znak, <i>CarcinoEmbryonic Antigen</i>
Ct hodnota	označuje hodnotu cyklu, kdy je přístroj schopen spolehlivě detekovat rostoucí fluorescenci
DCE	denaturační kapilární elektroforéza, <i>Denaturating Capillary Electrophoresis</i>
DGCR8	jaderný protein vázající dsRNA, <i>DiGeorge syndrome Critical Region 8</i>
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
EUS	endoskopická ultrasonografie
EUS-FNB	bioptický odběr tenkou jehlou pod kontrolou endoskopické ultrasonografie
FAM	6-karboxyfluorescein
FNAB	biopsie tenkou jehlou, <i>Fine Needle Biopsy</i>
GA733-2	tumorový znak, <i>Gastrointestinal tumor-associated Antigen 2</i>
CDKN2A	tumor supresorový gen, kóduje protein p16, <i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A</i>
CHP	chronická pankreatitida
DPC4	tumor supresorový gen, kóduje protein Dpc4, <i>Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4</i> , také <i>SMAD</i> nebo <i>SMAD4</i>
KRAS	onkogen, kóduje protein Ras, <i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KP	karcinom pankreatu
LOH	ztráta heterozygoty
miRISC	ribonukleoproteinový komplex miRNA s RISC, také miRNP
miRNP	ribonukleoproteinový komplex miRNA s RISC, <i>microRNA RiboNucleoProtein complex</i> , také miRISC
miRNA	mikroRNA, mezinárodně uznávaná zkratka
miRNA*	antisense molekula miRNA, v převážné většině případů je v průběhu biogeneze degradována, angl. také <i>passenger strand</i>
NK	nukleové kyseliny
PanIN	PANkreatická Intraepiteliální Neoplazie
PDAC	duktální adenokarcinom, <i>Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma</i>
pre-miRNA	prekurzorová struktura miRNA
pri-miRNA	primární struktura miRNA
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
qRT-PCR	PCR v reálném čase po předchozím přepisu RNA do cDNA reverzní transkripcí
Ras	malý G protein
RISC	multi-enzymový komplex vážící se k miRNA, <i>RNA Induced Silencing Somplex</i>
RNU6b	malá jaderná RNA, také RNU6-2, <i>RNA, U6 small nuclear 2</i>
Rsq	proložení všech bodů kalibrační křivky, angl. <i>amplification efficiency value</i>
RT	reverzní transkripce
TAMRA	karboxymethylrhodamin
TP53	tumor supresorový gen, kóduje protein p53, <i>Tumor Protein p53</i>
U6	malá nekódující jaderná RNA, která se účastní sestřihu
ZMB	zastoupení mutovaných buněk

Seznam zkratk použitých v experimentální části práce:

I1	Izolační souprava RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit - celková RNA
I2	Izolační souprava NucleoSpin FFPE RNA/DNA - celková RNA
I3	Izolační souprava mirPremier microRNA Isolation Kit - celková RNA
I4	Izolační souprava mirPremier microRNA Isolation Kit - malé RNA
Q1	qPCR souprava miScript SYBR Green PCR Kit
Q2	qPCR souprava PerfeCTa microRNA Assay
RT1	RT souprava miScript II RT Kit - maturované miRNA a malé RNA
RT2	RT souprava qScript microRNA cDNASynthesis Kit - maturované miRNA a malé RNA
RT3	RT souprava miScript II RT Kit - maturované miRNA, pre-miRNA, ncRNA a mRNA
RT4	RT souprava QuantiMir RT Kit - maturované miRNA a malé RNA
SL	pracovní označení EUS-FNB vzorku KP

1 Úvod

Rakovina slinivky břišní neboli karcinom pankreatu (KP) je jedním z nejobávanějších onemocnění vůbec. Navzdory současným medicínským pokrokům v diagnostice a léčbě maligních onemocnění, neexistuje žádný spolehlivý nástroj ani molekulární znak, který by s dostatečnou specifitou a citlivostí diagnostikoval KP v jeho časných stádiích. K tomu přispívá také absence a nespecifita příznaků. Pacienti tak v době diagnózy bývají již ve špatném zdravotním stavu a léčba nemívá výrazný účinek. Tímto se KP stává téměř nevyléčitelným onemocněním s velmi rychlým průběhem, kdy většina pacientů umírá již během několika týdnů až měsíců od stanovení diagnózy. Česká republika zaujímá ve výskytu KP první světové příčky, a tak se nás tato problematika bohužel velmi úzce týká (BOYLE a FERLAY 2005, SIEGEL *et al.* 2013, www.uzis.cz).

Hlavním cílem v boji proti tomuto onemocnění je zlepšení diagnostiky a odhadu prognózy, a to především nalezením vhodných molekulárních znaků. Jedním z velmi slibných molekulárních znaků jsou miRNA, 21-23 nukleotidů dlouhé jedno-řetězcové nekódující RNA regulující translaci mRNA. MiRNA jsou potencionálně využitelné jak k diagnostice a ke stanovení prognózy, tak i ke sledování průběhu onemocnění, predikci odpovědi na léčbu nebo návrhu nových léčebných terapií.

Existuje již řada studií, které dokázaly, že jsou některé miRNA rozdílně exprimovány v maligní oproti zdravé nebo zánětlivé tkáni pankreatu. Také se objevilo již několik prací poukazujících na prognostický význam některých miRNA. Naprostá většina těchto studií však pracuje se vzorky tkáně z resekovaného tumoru. Vzhledem k tomu, že je jen málo pacientů indikováno k operaci, nemají vzorky resekátů příliš velké využití v klinické praxi.

Velmi žádoucí je proto vyvinutí efektivní metodiky pro stanovení miRNA z bioptického odběru tkáně tenkou jehlou (FNB, *Fine Needle Biopsy*) pod kontrolou endoskopické ultrasonografie (EUS), který je běžně používán k diagnostice KP pomocí cytologického vyšetření. EUS-FNB je možné provádět bez ohledu na stádium onemocnění, je poměrně málo invazivní a výhodou je možnost opakovaného odběru. Detekce miRNA v bioptických vzorcích však vzhledem k minimálnímu množství odebrané tkáně představuje skutečně nelehký úkol. Navíc úspěšnost molekulárních vyšetření pankreatické tkáně bývá nižší v porovnání s ostatními tkáněmi, a tak správná volba postupu izolace nukleových kyselin a následných analýz včetně použitých komerčních souprav je klíčová. Limitované množství získané tkáně však nemá za následek pouze problémy s genetickými analýzami, ale ztěžuje i cytologickou interpretaci. Ložisko nádoru je velmi často zaměňováno s ložiskem zánětu,

zejména chronickou pankreatitidou, která je výrazným rizikovým faktorem vzniku KP a bývá chápána jako prekanceróza. Navíc je nádor obvykle zánětlivou tkání ohraničen. Cytologie proto často není schopna s jistotou určit charakter buněk a histologické vyšetření vzhledem k malému množství získané tkáně není možné, což vede i k nemožnosti viditelně ohraničit ložisko nádoru. Kvantifikaci miRNA v biotických vzorcích pankreatu tedy znepřístupňuje fakt, že není jasné, kolik skutečně nádorových buněk vzorek obsahuje (ELOUBEIDI *et al.* 2003, HEZEL *et al.* 2006, KLÖPPEL a ADSEY 2009, BOURNET *et al.* 2011).

Z těchto důvodů jsme jedna z pouhých čtyř laboratoří na celém světě, která se zabývá kvantifikací exprese miRNA ze vzorků EUS-FNB pomocí qRT-PCR (SZAFRANSKA *et al.* 2008, TORRISANI *et al.* 2009, ALI *et al.* 2012). Doposud jsme však jedinou laboratoří, která řeší problém s charakterem vzorku. Tato práce navazuje na předchozí studii naší laboratoře, ve které bylo zjištěno, že detekcí mutace v genu *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene* homolog) lze se 100% specifitou diagnostikovat KP (SALEK *et al.* 2007). Kombinace detekce mutací v *KRAS* s analýzou exprese miRNA tak přináší nové a jedinečné řešení této problematiky.

2 Přehled literatury

2.1 MiRNA

2.1.1 Obecná charakteristika a historie objevu miRNA

První miRNA (lin-4) byla objevena v roce 1993 laboratoří Victora Ambrose a laboratoří Garyho Ruvkuna, které se zabývaly studiem genů *Caenorhabditis elegans* (LEE *et al.* 1993, WIGHTMAN *et al.* 1993). MiRNA lin-4 a její mechanismus působení byl však po dlouhou dobu považován za biologickou zvláštnost specifickou pouze pro *Caenorhabditis elegans*. Proto další miRNA, let-7, byla objevena až v roce 2000, a to nejen u tohoto organismu, ale také u mnoha dalších druhů, včetně člověka (REINHART *et al.* 2000).

MiRNA, známé také pod názvem mikroRNA, jsou endogenní nekódující jedno-řetězcové RNA o délce 21 – 23 nukleotidů, jejichž hlavní funkcí je posttranskripční regulace genové exprese. Vyskytují se u různých organismů z říše živočichů a rostlin (AMBROS *et al.* 2003), a také u některých větších DNA virů, například u viru Epstein-Barrové a lidského cytomegaloviru (KIM a NAM 2006). MiRNA, podobně jako siRNA (*Small Interfering RNA*), patří mezi krátké nekódující RNA (sncRNA, *Small Non-Coding RNA*), tedy takové RNA, které nejsou translatovány v protein (HUTVÁGNER a ZAMORE 2002, ESTELLER 2011). Na rozdíl od siRNA jsou však miRNA výlučně kódovány jadernou DNA, jsou vždy endogenního původu, jsou značně mezidruhově sekvenčně konzervované a vznikají z jedno-řetězcových prekurzorových RNA, které vytvářejí vlásenkové struktury (AMBROS *et al.* 2003).

Hlavní funkcí miRNA je regulace genové exprese díky své komplementaritě ke specifickým sekvencím mRNA, což obvykle vede k umlčování genů prostřednictvím translační represe nebo cílové degradace (BARTEL 2009). Každá miRNA může regulovat až stovky cílových mRNA. Pomocí miRNA je ovlivněna exprese více než poloviny genů v lidském genomu, včetně těch, které hrají zásadní roli v procesech vývoje, apoptózy, proliferace a diferenciaci, a které se podílejí na regulaci imunitního systému, kmenových buněk a nádorové transformace (HANSEN *et al.* 2011).

V současné době je známo téměř 2600 lidských miRNA a počet nově identifikovaných neustále narůstá (mirbase.org).

2.1.2 Geny pro miRNA

U člověka se geny pro miRNA nacházejí na všech chromozomech, kromě chromozomu Y. Až 50 % se vyskytuje v podobě klastřů (pravděpodobně vzniklých genovou duplikací), které jsou přepisovány jako polycistronní primární transkripty. Zbývající polovina genů pro miRNA se nachází v daném místě genomu samostatně (KIM a NAM 2006, SLABÝ *et al.* 2012).

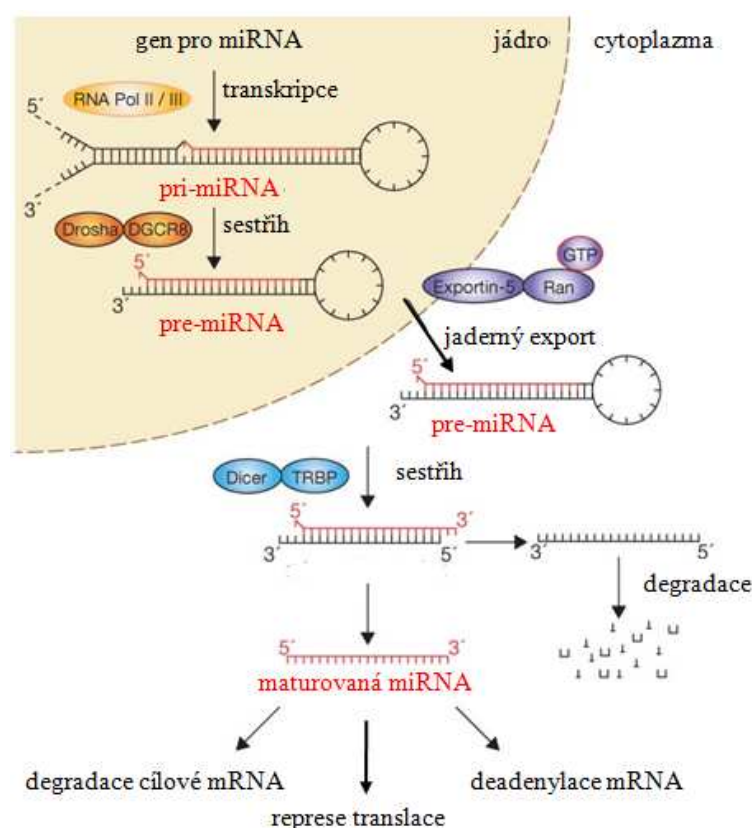
Sekvence miRNA se mohou nacházet buď v intergenových, exonových nebo intronových oblastech. Intergenové (mezigenové) geny pro miRNA jsou přepisovány jako 4 – 5 kilobází dlouhé primární transkripty s jasně definovaným startovacím nukleotidem a polyadenylačním signálem. U exonových genů mohou být miRNA přepisovány díky jednomu promotoru společnému s genem, kde se nacházejí. V tomto případě pak často vznikem miRNA dochází k cílenému umlčování daného genu. MiRNA, jejichž geny leží v intronových oblastech, mohou být rovněž přepisovány s genem v předchozím exonu a následně mohou být vyštěpeny spolu s intronem, anebo mohou mít vlastní promotor a sdílet jej s ostatními miRNA v klastru. Speciálním případem intronových genů pro miRNA jsou takzvané miRtrony, tedy introny přesně odpovídající sekvenci prekurzorové miRNA (viz 2.1.3 Biogeneze miRNA) (OLENA a PATTON 2010).

2.1.3 Biogeneze miRNA

Kroky biogeneze u člověka (Obr. 2.1) nejsou pro všechny miRNA univerzální, a to díky variabilní transkripci specifických regulačních proteinů působících v jejich maturační dráze. Jeden primární transkript miRNA (tzv. pri-miRNA) dlouhý několik tisíc párů bází pak může dát vzniku až šesti miRNA (WINTER *et al.* 2009).

MiRNA jsou v naprosté většině případů přepisovány RNA polymerázou II (stejně tak jako mRNA a většina snRNA), jejich transkripty jsou opatřeny čepičkou na 5' konci, polyadenylačním signálem na 3' konci, a mohou se účastnit sestřihu a editace. Některé miRNA jsou přepisovány pomocí RNA polymerázy III, a to zejména ty, jejichž geny se nacházejí v 5' oblasti tRNA genů, Alu sekvencí a MWIR (*Mammalian Wide Interspersed Repeat*) promotorových oblastí. Transkripce genů pro miRNA je regulována stejnými mechanismy jako u ostatních genů (například transkripčními faktory, methylací CpG ostrůvků, modifikacemi chromatinu, enhancery apod.) (LEE *et al.* 2004, WINTER *et al.* 2009).

Vzniklá pri-miRNA je dvou-řetězcová vlásenka, na kterou se váže jaderný protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region 8*), který se poté spojí s ribonukleázou III (RNasa III) Drosha a společně tak vytvářejí tzv. mikroprocesorový komplex (Obr. 2.1) (FALLER a GUO 2008). Mikroprocesorový komplex štěpí pri-miRNA na prekurzorovou strukturu miRNA (tzv. pre-miRNA) dlouhou přibližně 70 nukleotidů. Mechanismus je takový, že DGCR8 navázaný na pri-miRNA orientuje katalytickou RNázovou doménu proteinu Drosha k místu štěpení (toto místo je vzdáleno přibližně 11 nukleotidů od vlásenky). Drosha poté štěpí oba řetězce pri-miRNA. Výsledným produktem je pre-miRNA s dvou-nukleotidovým přesahem na 3' konci (GREGORY *et al.* 2006).



Obr. 2.1. Schématické znázornění hlavní biogenické dráhy miRNA živočichů (upraveno podle WINTER *et al.* 2009).

Dvou-nukleotidový přesah na 3' konci vlásenky pre-miRNA je poté rozpoznán transportním proteinem Exportinem 5 (Obr. 2.1), který transportuje pre-miRNA do cytoplazmy. Exportin však k úspěšnému transportu potřebuje také malý protein Ran s GTPázovou aktivitou, který je součástí transportního komplexu (*RAs-related Nuclear protein*) (MURCHISON a HANNON 2004).

V cytoplazmě dochází k vazbě pre-miRNA na multi-proteinový komplex endonukleázy Dicer (RNasa III), proteiny Argonautové rodiny a RNA vazebné proteiny - TRBP (*HIV-1 TAR RNA Binding Protein*) a PACT (*Protein Activator of the interferon induced protein kinase*) (WINTER *et al.* 2009). Dicer interaguje s 3' koncem pre-miRNA a sestříhne její smyčku. To, kde bude pre-miRNA sestřížena, ovlivňuje její celková délka, velikost její smyčky a nekomplementární nukleotidové páry v jejích dvou-řetězcových oblastech (LUND a DAHLBERG 2006). Výsledkem sestříhu Dicerem jsou dva řetězce maturované miRNA, které se označují jako "guide strand" (vedoucí) a "passenger strand". Zatímco vedoucí řetězec zůstává inkorporován v multi-proteinovém komplexu, druhý řetězec označovaný „hvězdičkou“ je uvolněn a degradován. Určení vedoucího řetězce probíhá na základě stability párování bazí na jeho 5' konci, kdy je vedoucí řetězec tím méně stabilním. Zpravidla vzniká z jedné pre-miRNA pouze jeden řetězec maturované miRNA (Obr. 2.1), avšak v některých tkáních, při maligní transformaci, či v závislosti na vývojovém stádiu, nemusí dojít k zániku druhého řetězce a množství maturovaných řetězců miRNA a miRNA* může být různorodé. Každý řetězec, pokud je znám, je v nomenklatuře označen koncovkou "–3p" nebo "–5p" indikující bližší pozici k 3' konci, respektive 5' konci, vlásenky (GRIFFITHS-JONES *et al.* 2006).

2.1.4 Variabilita miRNA

Různorodost výsledných miRNA, kromě výše zmíněné regulace transkripce, sestříhu a výběru maturovaného řetězce, zajišťuje také editace. Jde o tkáňově specifické zpracování sekvence pri-miRNA a/nebo pre-miRNA, například enzymem ADAR (*Adenosin Deaminase that Acts on RNA*), vedoucí k tvorbě různých maturovaných miRNA, a ty pak mohou působit na rozdílné mRNA. ADAR konvertuje adenosiny na inosiny, které preferují párování s cytosiny, a proto jejich párování s uracylem způsobí menší stabilitu dvou-řetězcové pri-miRNA nebo pre-miRNA a ovlivní zpracování enzymy Drosha a Dicer (FALLER a GUO 2008). Tímto způsobem vznikají tzv. izomiRs, tedy podobné miRNA s místně specifickými modifikacemi (substituce nukleotidů, délková variabilita), které ještě více zvyšují celkovou rozmanitost a rozsah působení těchto malých nekódujících RNA. IsomiRs mohou mít vliv na zpracování svých prekurzorových struktur enzymy Drosha a Dicer, a tím mohou vést i k rozdílnosti stability řetězců nebo rozdílnému místu sestříhu (MORIN *et al.* 2008).

Variabilitu biogeneze a funkce miRNA ovlivňují také jedno-nukleotidové polymorfismy v jejich sekvencích. Ty mohou mít za následek blokaci, snížení nebo zvýšení schopnosti zrání pri-miRNA na pre-miRNA, redukci zpracování pre-miRNA na maturovanou miRNA či změnu preference maturovaných řetězců (SLABÝ *et al.* 2012).

V databázi miRNA – miRBase – tak nalezneme mnoho sekvencí pocházející z jedné miRNA, které se liší délkou, sekvencí a preferencí vedoucího řetězce (miRNA-3p a miRNA-5p) (Obr. 2.2) (mirbase.org).



Obr. 2.2. Sekvence pre-miRNA hsa-let-7a-1 (hsa – homo sapiens sapiens) ve směru od 5' konce ke 3' konci a závěry sekvenování maturované hsa-let-7a-1-5p (vlevo) a hsa-let-7a-1-3p (vpravo) znázorněné sloupcovými grafy vyjadřující počet přečtení daného nukleotidu u maturované sekvenze (mirbase.org).

2.1.5 Regulační funkce miRNA

MiRNA může svou funkci vykonávat pouze s navázaným komplexem proteinů, tzv. RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). RISC zahrnuje proteiny, které pomohly k sestřížení vlásenky pre-miRNA a odtržení *passenger strand*, mimo jiné tedy enzym Dicer, proteiny Argonautové rodiny a RNA vazebné proteiny. RISC s inkorporovanou miRNA je znám pod názvem miRISC (v literatuře se také můžeme setkat s pojmem miRNP (*microRNA RiboNucleoProtein complex*)) (RANA 2007, PRATT a MACRAE 2009).

MiRISC se váže na nedokonale komplementární místa v 3' UTR oblasti mRNA, vazba na 5' UTR nebo kódující oblasti je vzácná (ØROM *et al.* 2008, KROL *et al.* 2010). Úplná komplementarita miRNA a cílové mRNA umožňuje degradaci mRNA (například její destabilizací nebo prostřednictvím indukce její deadenylace), neúplná komplementarita má za následek inhibici translace (CARTHEW a SONTHEIMER 2009, EULALIO *et al.* 2009). Zatímco úplná komplementarita miRNA s mRNA je typická u rostlin (HE a HANNON 2004, BRODERSEN *et al.* 2008), živočišné miRNA jsou s cílovými transkripty většinou pouze parciálně komplementární. Obvykle se jedná o 6 - 8 nukleotidů dlouhé úseky na 5' konci miRNA (LEWIS *et al.* 2003, LEWIS *et al.* 2005).

2.1.6 Degradace miRNA

Biologický poločas, degradace a regulační mechanismy metabolismu jednotlivých miRNA nejsou příliš prozkoumány, nicméně je všeobecně uznáváno, že jsou to vysoce stabilní molekuly. V některých tkáních dosahuje jejich biologický poločas mnoha hodin, nebo až dnů (VAN ROOIJ *et al.* 2007, GATFIELD *et al.* 2009). MiRNA, které nejsou navázány na mRNA, jsou rychleji degradovány než ty, které jsou v komplexu s RISC. Degradace maturovaných miRNA je zajištěna pomocí exoribonukleáz ve směru od 5' k 3' konci, nebo malých RNA degradujících nukleáz ve směru od 3' k 5' konci, jak bylo popsáno u *Caenorhabditis elegans*, respektive u rostlin. V živočišném genomu jsou kódovány podobné enzymy, avšak jejich funkce nebyla prozatím blíže popsána v konkrétním vztahu k miRNA (KEDDE *et al.* 2007, GROSSHANS a CHATERJEE 2010).

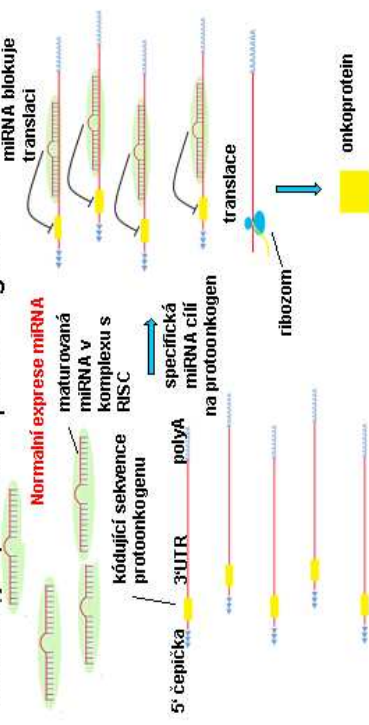
2.1.7 MiRNA a nádorová onemocnění

Důkazů o funkcích miRNA v regulaci kancerogeneze neustále přibývá. Některé miRNA regulují hladiny protoonkogenů či tumor supresorových genů a dopady jejich změněné exprese v tumorové oproti zdravé tkáni jsou tak pro maligní transformaci zásadní. Zvýšená translace onkogenu může být způsobena konkrétní miRNA, jejíž exprese je v nádoru výrazně snížena. V literatuře se díky vlastnostem takovýchto miRNA často setkáváme s pojmem “tumor supresorové miRNA“. Analogicky existují také “onkogenní miRNA“, které naopak inhibují translaci tumor supresorových genů a v nádoru se vyskytují ve zvýšené hladině (viz Obr. 2.3). Na základě studií miRNA v různých nádorových tkáních je v současné době znám profil exprese sad tkáňových miRNA, které byly potvrzeny v několika nezávislých studiích a mohou tedy sloužit jako potenciální nádorové znaky (NANA-SINKAM *et al.* 2010).

TUMOR SUPRESOROVÉ miRNA

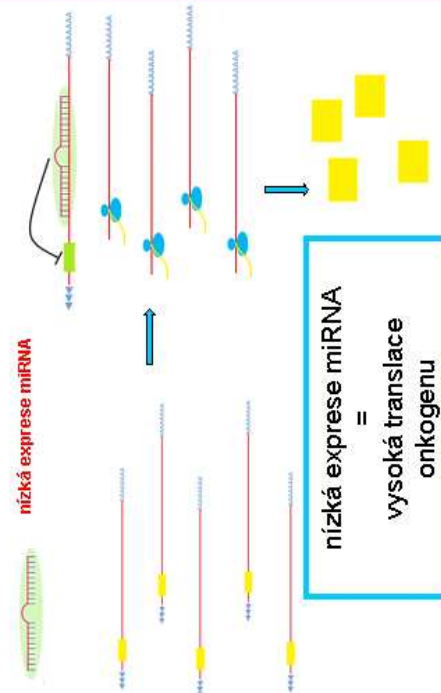
a) NORMÁLNÍ TKÁŇ

miRNA reguluje translaci protoonkogenu



b) TUMOROVÁ TKÁŇ

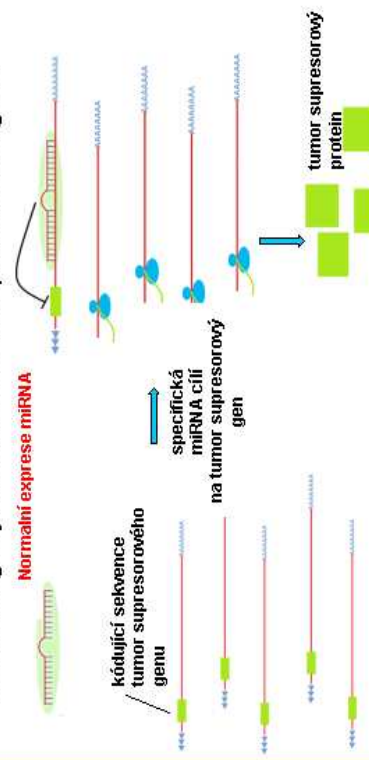
miRNA má funkci tumor supresoru



PROTOONKOGENNÍ miRNA

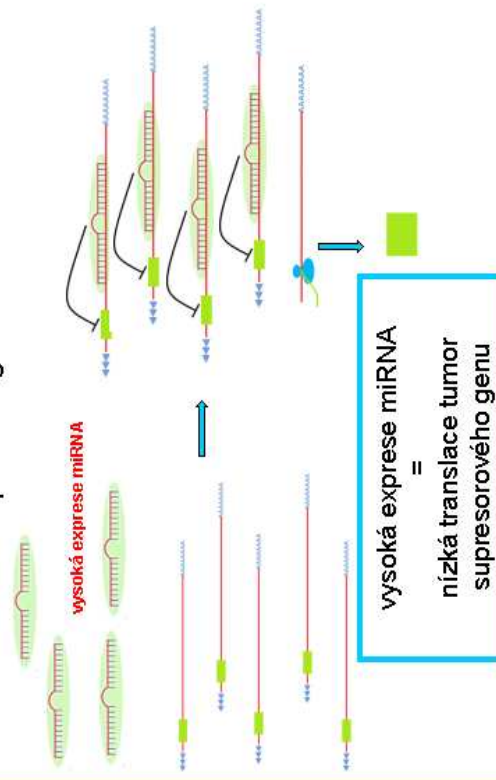
c) NORMALNÍ TKÁŇ

miRNA reguluje translaci tumor supresorového genu



d) TUMOROVÁ TKÁŇ

miRNA má funkci protoonkogenu



Obr. 2.3. MiRNA a dopad jejich změněné exprese na regulaci protoonkogenu a tumor supresorů. Některé miRNA fungují jako negativní regulátory exprese protoonkogenu a plní tak funkci tumor supresorových miRNA (a). Při snížených hladinách těchto miRNA dochází ke zvýšení hladiny cílových onkogenu a k rozvoji nádorového bujení (b). Jiné miRNA, jež cílí na tumor supresory a udržují tak jejich standardní hladinu - protoonkogenní miRNA (c), při zvýšené expresi fungují jako onkogenní, tedy zabraňují translaci tumor supresorů téměř zcela a opět dochází k malignímu procesu (d).

2.2 Karcinom pankreatu

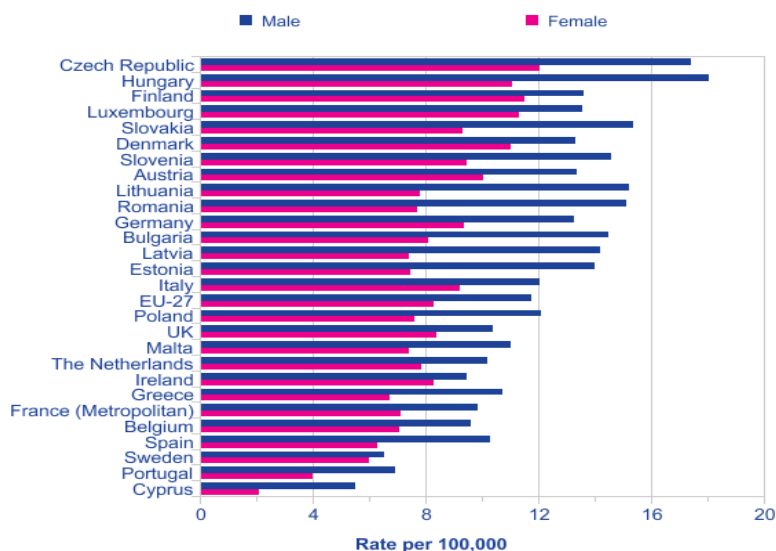
Onkologická onemocnění jsou významným problémem veřejného zdraví. Velmi znepokojující je fakt, že výskyt nádorových onemocnění stále roste. V Evropě je během života diagnostikována rakovina jedné třetiny lidí a je příčinou až jedné čtvrtiny všech úmrtí (SANT *et al.* 2003).

Pankreas, nebo také slinivka břišní, je v lidském těle jedním z nejdůležitějších orgánů regulujících metabolické a trávicí pochody. Její onemocnění jsou proto velmi vážná. Karcinom pankreatu (KP) je nádorové onemocnění, které kromě zvyšující se incidence v populaci vykazuje vysokou mortalitu, a to i v případech časného zjištění malignity. V dnešní době medicínských pokroků a nových diagnostických možností zůstává stále onemocněním s velmi závažnou prognózou i navzdory znalostem molekulárně-biologických procesů zapojených v její patogenezi (ŠÁLEK 2005).

2.2.1 Epidemiologie a prognóza karcinomu pankreatu

Přestože KP nezaujímá svou incidencí přední světové příčky, je jedním z nejzákeřnějších maligních onemocnění. KP je charakteristický vysokou úmrtností, která se téměř rovná své incidenci. Prognóza je prakticky beznadějná, onemocnění má velice rychlý a fatální průběh. Důvodem je především časná tvorba metastáz, absence a nespecifita příznaků, a tím tedy i pozdní stanovení diagnózy. Pravděpodobnost pětiletého přežití se odhaduje na 5,1 %, přičemž většina pacientů umírá už v prvním roce od stanovení diagnózy (BOYLE a FERLAY 2005, SIEGEL *et al.* 2013, www.uzis.cz).

V přepočtu na obyvatele je Česká republika v incidenci KP první v Evropě (Obr. 2.4) a druhá na světě. Standardizovaná incidence je v ČR 20,8 mužů a 17,9 žen na sto tisíc mužů, respektive žen. Každoročně je u nás zaznamenáno přes 2 000 nových případů a téměř 1 900 případů úmrtí, což KP řadí na 5. příčku nejčastější příčiny úmrtí na zhoubné novotvary v ČR (www.uzis.cz).



Obr. 2.4. Výskyt karcinomu pankreatu v Evropě v roce 2008 přepočítaný na 100 000 obyvatel. Graf také ukazuje, že je KP častější u mužů (www.cancerresearchuk.org).

2.2.2 Klasifikace karcinomů pankreatu

Z histologického hlediska můžeme KP rozdělit na duktální adenokarcinomy (pancreatic ductal adenocarcinoma = PDAC) (96,3 %), cystické (2 %) a neuroendokrinní tumory (1 %), lymfomy a metastázy nádorů jiných lokalizací (0,7 %) (JEMAL *et al.* 2003).

Klinická TNM klasifikace podle UICC (International Union Against Cancer) rozděluje tumory pankreatu (pod zkratkou C25) do několika tříd na základě charakteristik primárního nádoru, přítomnosti metastáz v regionálních mízních uzlinách a přítomnosti vzdálených metastáz (Tab. 2.1) (www.uzis.cz). Celkově lze takovou klasifikaci popsat stádium onemocnění, tzv. *staging*, kde stádium IV je hodnoceno jako nejzávažnější (Tab. 2.2).

Tab. 2.1. TNM klasifikace KP (upraveno podle www.uzis.cz).

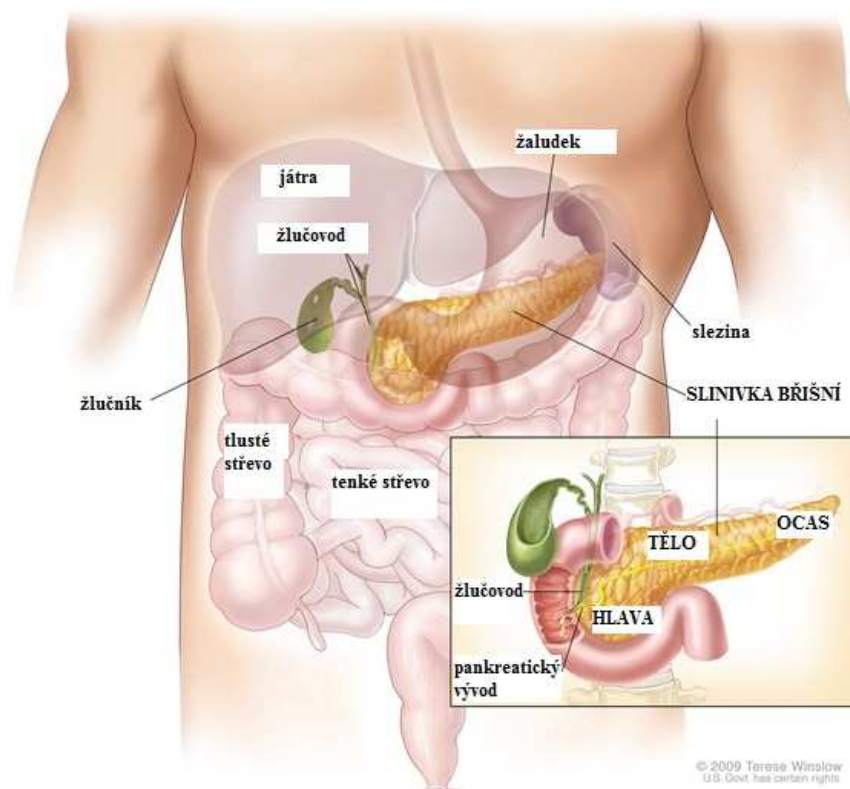
Charakteristika primárního nádoru	T0	není přítomen
	Tis	karcinom <i>in situ</i>
	TX	nelze hodnotit
	T1	omezen na pankreas ≤ 2 cm
	T2	omezen na pankreas > 2 cm
	T3	šíří se i mimo pankreas
	T4	zasahuje do <i>truncus coeliacus</i> nebo <i>a. mesenterica superior</i> *
Přítomnost metastáz v regionálních mízních uzlinách	N0	nejsou přítomny
	NX	nelze hodnotit
	N1	přítomnost
Přítomnost vzdálených metastáz	M0	nejsou přítomny
	MX	nelze hodnotit
	M1	přítomnost

* Viscerální nepárové větve břišní aorty

Tab. 2.2. Stádia onemocnění u KP – *staging* (upraveno podle www.uzis.cz).

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1, T2, T3	N1	M0
Stadium III	T4	jakékoliv N	M0
Stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Podle anatomické lokalizace rozlišujeme karcinomy hlavy (C25.0), těla (C25.1) nebo ocasu (C25.2) pankreatu, pankreatického vývodu (C25.3) (viz Obr. 2.5) a Langerhansových ostrůvků u endokrinního karcinomu (C25.4), z nichž nejčastěji se vyskytuje karcinom v oblasti hlavy pankreatu (HLAVSA *et al.* 2008, www.uzis.cz).

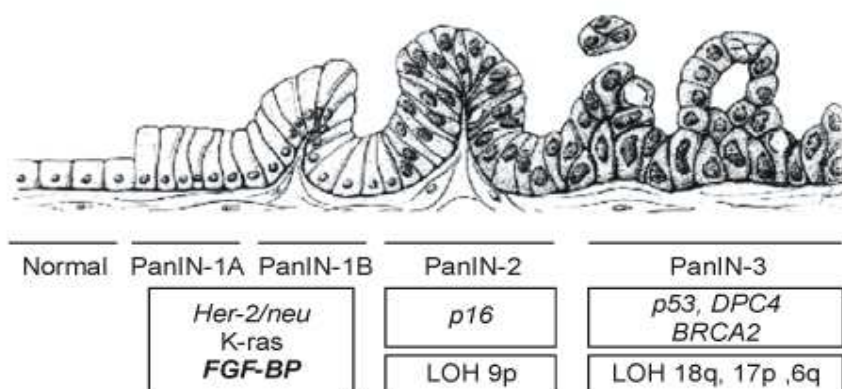


Obr. 2.5. Anatomie slinivky břišní (upraveno podle obrázku „Normal Pancreas Anatomy“ www.cancer.gov).

2.2.3 Molekulární podstata karcinomu pankreatu

Vznik a rozvoj nádorového onemocnění je několikastupňovým procesem, kdy dochází ke kumulaci chyb v DNA vyvolaných působením fyzikálních, chemických či biologických mutagenů.

Pro KP byly vypracovány studie, které popisují postupnou akumulaci genetických a cytologických změn. Na tomto základě byl navržen model klasifikace rozvoje KP označovaný jako model pankreatické intraepiteliální neoplazie (PanIN). Ten charakterizuje rozvoj KP dle postupných změn buněk do 4 stádií (Obr. 2.6). PanIN-1A a PanIN-1B představují žádnou či lehkou atypii buněk, PanIN-2 značí mírnou atypii s tvorbou vícejaderných buněk a PanIN-3 těžkou atypii a invazivitu tkáně slinivky (HRUBAN *et al.* 2001). Na molekulární úrovni se na rozvoji onemocnění podílí mutace v regulačních a kódujících genech, genové amplifikace či delece, ztráty heterozygosity (LOH), případně dochází také ke změnám ploidity. V úvodních fázích PanIN-1A a PanIN-1B dochází ke vzniku mutací v protoonkogenu *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), k aktivaci a zvýšené expresi protoonkogenu *HER2* (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) a zvýšené expresi *FGF-BP* (*Fibroblast Growth Factor - Binding Protein*). Ve stádiu PanIN-2 dochází k inaktivaci tumor supresorového genu *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2A*) kódujícího protein p16 a ztrátě heterozygosity na krátkém raménku chromozomu 9. Ve stádiu PanIN-3 dochází k inaktivaci dalších tumor supresorů, jako je *TP53* (*Tumor Protein p53*), *BRCA2* (*BREast CANcer 2, early onset*) a *DPC4* (*Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4*, také *SMAD* nebo *SMAD4*), a ztrátám heterozygosity na chromozomech 6, 17 a 18 (LI a JIAO 2003, MINÁRIK a MINÁRIKOVÁ 2005). Model pankreatické intraepiteliální neoplazie je v současné době rozšiřován o další geny či miRNA (viz 2.3.2 Diagnostika karcinomu pankreatu pomocí miRNA).

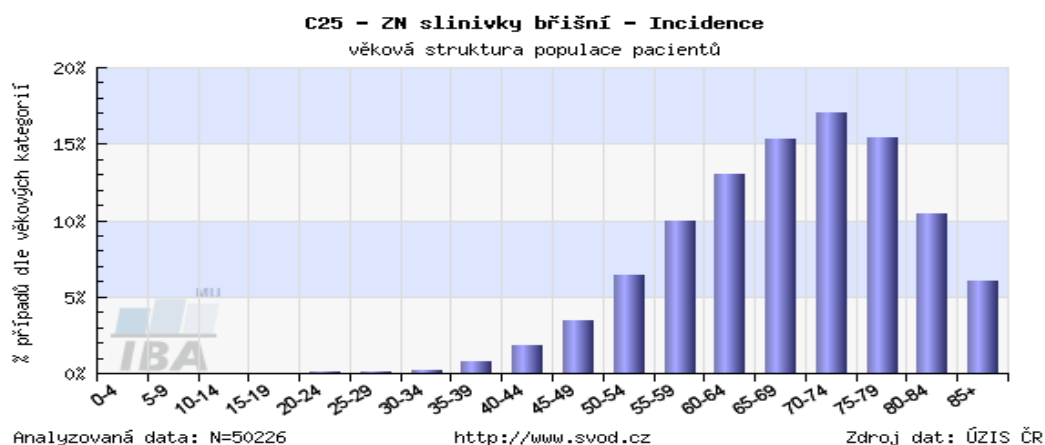


Obr. 2.6. PanIN model vývoje karcinomu pankreatu (TASSI a WELLSTEIN 2006).

U nejčastějších typů KP - ductálních adenokarcinomů - se nejčastěji vyskytují mutace v genech *KRAS*, a to u 71 %, *TP53* u 52 %, *CDKN2A* u 23 %, *DPC4* u 22 %, *ARID1A* (*AT-Rich Interactive Domain-containing protein 1A*) u 7 % a *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) u 6 % případů (databáze COSMIC, cancer.sanger.ac.uk/cosmic).

2.2.4 Rizikové faktory vzniku karcinomu pankreatu

Nejsilnějším rizikovým faktorem pro vznik KP je věk. V ČR je KP zastoupen až z 80 % u pacientů s věkem nad 60 let (Obr. 2.7). Vzhledem ke stoupajícímu průměrnému věku naší populace se dá v blízkých letech očekávat další nárůst jeho incidence (ŠÁLEK 2005, www.uzis.cz).



Obr. 2.7. Incidence karcinomu pankreatu v ČR dle věku (DUŠEK *et al.* 2005).

Z faktorů vnějšího prostředí je nejsilnějším a nejsnáze ovlivnitelným faktorem kouření cigaret. Kouření má výrazný vliv na zvýšené riziko rozvoje KP, pravděpodobně kvůli působení N-nitrosaminů obsažených v cigaretovém kouři, které se dostávají do pankreatického vývodu. Velmi často byl v této souvislosti diskutován také vliv alkoholu, ale v současné době se zdá, že působí na vznik KP nepřímo prostřednictvím vyvolání chronického zánětu – chronické pankreatitidy, která riziko vzniku výrazně zvyšuje (viz dále). Mezi další možné hypotézy exogenních rizikových faktorů vzniku KP můžeme zařadit životní styl (způsob stravování, obezita) a expozici kadmium a chromu (DOBELBOWER *et al.* 1997, NEOPTOLEMOS *et al.* 2004, ŠÁLEK 2005).

Z endogenních faktorů je nejvyšším rizikem chronická pankreatitida (CHP). Vlivem CHP jsou poškozené buňky pankreatu při probíhající hojení citlivější k růstovým

faktorům, které mohou usnadnit jejich nádorovou transformaci. K dalším endogenním rizikovým faktorům patří snížená glukózová tolerance u cukrovky, stav po částečném chirurgickém odstranění žaludku a některé dědičné faktory (například hereditární pankreatitida, cystická fibróza a familiární adematózní polypóza) (FISHER 2001, GHADIRIAN *et al.* 2003, ŠÁLEK 2005).

2.2.5 Diagnostika a léčba karcinomu pankreatu

Diagnostika KP je velmi obtížná a v současné době neexistují spolehlivé nástroje, které by odhalily toto onemocnění v časných stádiích. Ta jsou většinou asymptomatická a v době projevujících se nespecifických a často podceňovaných příznaků jako je únava, hubnutí, nechutenství, bolest břicha či žloutenka způsobená útlakem dvanáctníku, bývá onemocnění již v pokročilém stádiu. Ostatně tuto problematiku odráží také statistické údaje, kdy přes 56 % zjištěných malignit je diagnostikováno až ve stádiu IV, tedy v době, kdy jsou přítomny i vzdálené metastázy, oproti necelým 5 % ve stádiu I (BAKKEVOLD *et al.* 1992, www.uzis.cz).

Metodami první volby pro stanovení diagnózy jsou zobrazovací metody. Nejdříve se jedná o vyšetření pomocí ultrazvuku, následně CT (*Computed Tomography*) nebo MRI (*Magnetic Resonance Imaging*) a nakonec EUS (Endoskopická UltraSonografie). Vyšetření pomocí EUS může definitivně potvrdit nález, obzvláště pokud se doplní o biopsii vzorku tenkou jehlou (FNB, *Fine Needle Biopsy*). Výhodou EUS je zachyt i malých ložisek, která nejsou patrná při jiných zobrazovacích metodách.

Diagnostický význam laboratorních vyšetření je nevypovídající. Z nádorových znaků se nejčastěji vyšetřují mucinové antigeny CA 19-9, CA 242, CA 50 a CA 72-4, ale vzhledem k jejich poměrně nízké specifitě i senzitivitě mají význam spíše při sledování progresu onemocnění než při diagnostice (JIANG *et al.* 2004, ZAVORAL 2005, HLAVSA *et al.* 2008).

Co se týče léčby KP, zásadním řešením je resekce tumoru následovaná adjuvantní terapií gemcitabinem. Ten se podává i v pokročilých stádiích, případně v kombinaci s radioterapií nebo cílenou léčbou erlotinibem. Další volbou je režim FOLFOXIRI (kombinace 5-fluorouracilu, oxaliplatinu, irinotekanu a kyseliny listové). V pokročilých stádiích je také důležité potlačení symptomů, jako je například drenáž žlučových cest při útlaku dvanáctníku nebo podávání analgetik (BURRIS *et al.* 1997, SLATER *et al.* 2010).

2.3 MiRNA a karcinom pankreatu

2.3.1 MiRNA ovlivňující důležité procesy maligní transformace tkáně pankreatu

Současné publikované vědecké články zabývající se miRNA a ovlivněním procesů vedoucích k maligní transformaci u KP se většinou opírají o závěry z *in vitro* studií na buněčných liniích získaných z maligních buněk KP s případně inaktivovanými studovanými geny. Jedná se zejména o studie zabývající se vlivem miRNA na postup buněčným cyklem, reparaci DNA, apoptózu, invazivitu, angiogenezi a metastazování.

▪ Postup buněčným cyklem a proliferace

Kontrolní body a rychlost průběhu buněčným cyklem jsou důležitými regulátory buněčné proliferace. Nekontrolovatelná proliferace buněk je jedním z klíčových procesů vedoucích k maligní transformaci. V souvislosti s KP byly provedeny studie, které naznačují vliv některých miRNA majících potenciál proliferaci regulovat.

Nedávno publikované studie poukázaly na schopnost několika miRNA negativně působit na tumor supresorové geny, které regulují postup buněčným cyklem. Například onkogenní miR-21 ovlivňuje tumor supresor *PTEN* (*Phosphatase and TENsin homolog*), jež brání proliferaci nádorových buněk a reguluje frekvenci dělení. U KP dochází ke zvýšené expresi miR-21, čímž je snižována tumor supresorová funkce *PTEN* (PARK *et al.* 2009). Dalším příkladem onkogenních miRNA působících na tumor supresory účastnících se regulace buněčného cyklu jsou miR-221, miR-192 a miR-424-5p (WU *et al.* 2013, ZHAO *et al.* 2013).

Naopak některé tumor supresorové miRNA mohou ovlivňovat expresi protoonkogenů řídících progresi buněčným cyklem. Takovouto miRNA je například tumor supresorová miR-143, která cílí protoonkogen *KRAS* a u KP byla nalezena ve snížené hladině (HU *et al.* 2012). Dále lze uvést tumor supresorové miR-203, miR-124, miR-126, let-7-d (HU *et al.* 2012, JIAO *et al.* 2012, XU *et al.* 2013, WANG *et al.* 2014).

▪ Reparační DNA a apoptóza

Pokud dochází za normálních okolností k poškození DNA, například vlivem genotoxického stresu, nastává v buňce široké spektrum procesů vedoucích ke konečné opravě poškozených úseků, anebo k programované buněčné smrti – apoptóze. Pokud však dojde

k abnormalitám funkce tumor supresorů nebo protoonkogenů, může být celá kaskáda oprav DNA a apoptózy narušena a buňky získají maligní potenciál.

Často studovaný gen hrající roli v apoptóze a reparaci DNA je tumor supresor *TP53* (proteinový produkt p53). Protein p53 reguluje kromě apoptózy a reparace DNA také angiogenezi a buněčnou senescenci (RAVER-SHAPIRA *et al.* 2007). Globální analýzy exprese identifikovaly řadu miRNA, které jsou součástí transkripční dráhy zprostředkované proteinem p53 a podílí se tedy na její regulaci. Jedná se zejména o tumor supresorovou miR-34a a protoonkogenní miR-155. MiR-34a pozitivně reguluje apoptózu a DNA reparaci a negativně buněčný cyklus a angiogenezi. Tato miRNA je u tkáně KP více než dvojnásobně snížena vzhledem k normální duktální epiteliální tkáni, či není exprimována vůbec díky deleci její kódující oblasti (CHANG *et al.* 2007, HABBE *et al.* 2009, KENT *et al.* 2009). MiR-155 cílí pro-apoptotický gen *TP53INP1* (*Tumor Protein p53-Inducible Nuclear Protein 1*) aktivovaný pomocí p53. Zvýšené hladiny miR-155 u KP tak zamezují apoptóze (GIRONELLA *et al.* 2007, CHANG *et al.* 2007).

Apoptózu ovlivňují prostřednictvím cílení jiných transkriptů také snížené hladiny miR-203 nebo zvýšené hladiny miR-150* (tento řetězec maturované miRNA má za normálních okolností v buňce zanikat) a miR-630 (HU *et al.* 2012, FARHANA *et al.* 2013, XU *et al.* 2013).

▪ Tvorba metastáz a invazivita nádorů

Schopnost tvorby metastáz a invaze tumorových buněk je významným faktorem, který ovlivňuje progresi nádorového onemocnění. Důležitým krokem těchto změn je diferenciace buněk, tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). U epiteliálních typů nádorů dochází k přeměně epiteliálních buněk na buňky mezenchymální, které mohou mimo jiné projít skrze bazální membránu a invadovat do krevního řečiště. Hlavním znakem EMT je ztráta mezibuněčných kontaktů, která koreluje se sníženou expresí transmembránového proteinu E-kadherinu (*Epithelial cadherin*) zastupujícího důležitou roli v buněčné adhezi. E-cadherin je potlačen u několika typů rakoviny, včetně KP, a to pomocí jeho represorů *ZEB1* (*Zinc finger E-box-Binding homeobox 1*) a *SIP1* (*Smad-Interacting Protein 1*, také *ZEB2*, *SMADI1*). *ZEB1* a *SIP1* jsou tak aktivátory EMT (VANDEWALLE *et al.* 2005, AIGNER *et al.* 2007, BRACKEN *et al.* 2008, SPADERNA *et al.* 2008, LI A. *et al.* 2010).

Bylo prokázáno, že členové rodiny miR-200 (miR-200a, b, c, miR-141, miR-429) a proteiny *ZEB1* a *SIP1* vzájemně negativně regulují mechanismus zpětnovazebné smyčky

kontroly EMT. Obecně platí, že snížení exprese miRNA z rodiny miR-200 může vyvolat epiteliálně-mezenchymální přechod. Podobná data byla publikována i pro miR-203. Nedávno byly nalezeny další miRNA, miR-208 a miR-15a, které se přímo podílí na EMT. Po nadměrné expresi miR-208 a miR-15a došlo ke zvýšené expresi E-kadherinu, což naznačuje, že tyto miRNA podporují EMT (BRACKEN *et al.* 2008, BURK *et al.* 2008, GREGORY *et al.* 2008, KORPAL *et al.* 2008, PARK *et al.* 2008, WELLNER *et al.* 2009, GUO *et al.* 2014, LIU *et al.* 2014, LU *et al.* 2014, MIAO *et al.* 2014).

Další studie uvádí, že s tvorbou metastáz a invazivitou KP souvisí také protoonkogenní miR-21, která cílí tumor supresorový gen *RECK* (*REversion-inducing-Cysteine-rich protein with Kazal motifs*). Zvýšené hladiny miR-21 zabraňují translaci genu *RECK*, který za normálních okolností zabraňuje migraci a invazi buněk. Dalšími miRNA, které vedou k migraci a invazi buněk prostřednictvím deregulace proteinů s tímto jevem souvisejících, jsou například tumor supresorové miR-143 a miR-124 a protoonkogenní miR-10a a miR-146a (PARK *et al.* 2009, WEISS *et al.* 2009, LI Y. *et al.* 2010, HU *et al.* 2012, OHUCHIDA *et al.* 2012, WANG *et al.* 2014).

2.3.2 Diagnostika karcinomu pankreatu pomocí miRNA

Snaha o nalezení co nejčasnější, dostatečně citlivé a specifické diagnostické metody u KP je jedním z nejvyšších cílů současného zkoumání v souvislosti s tímto onemocněním.

Všechny miRNA, které se u KP objevily v abnormálních hladinách oproti zdravé tkáni či chronické pankreatitidě nebo korelují se stupněm PanIN, mají potencionální diagnostický význam, a tak se v poslední době stávají velmi slibnými znaky KP.

▪ Chronická pankreatitida a zdravá tkáň versus KP

Mnoho vědeckých týmů se zabývá aberantními expresemi miRNA v tumorové tkáni pankreatu oproti zdravé tkáni nebo chronické pankreatitidě, jelikož riziko vzniku karcinomu slinivky je u osob trpících CHP zvýšeno až 16krát. Analýza aberantně exprimovaných miRNA by mohla dopomoci k přesnější diagnostice a časnému zachytu KP (LOWENFELS *et al.* 1999).

Dosud bylo odhaleno velké množství miRNA rozdílně exprimovaných v různých tkáních pankreatu. Mezi nejčastěji uváděné, u kterých bylo potvrzeno, že jsou exprimovány ve zvýšené hladině u KP, patří miR-21 (BLOOMSTON *et al.* 2007, LEE *et al.* 2007, DILLHOFF *et al.* 2008, WANG *et al.* 2009, PREIS *et al.* 2011, BAUER *et al.* 2012,

JAMIESON *et al.* 2012, LIU R. *et al.* 2012, FRAMPTON *et al.* 2014), miR-155 (BLOOMSTON *et al.* 2007, SZAFRANSKA *et al.* 2007, WANG *et al.* 2009, GREITHER *et al.* 2010, KONG *et al.* 2011, JAMIESON *et al.* 2012), miR-196a (BLOOMSTON *et al.* 2007, SZAFRANSKA *et al.* 2007, WANG *et al.* 2009, KONG *et al.* 2011, LIU J. *et al.* 2012, SCHULTZ *et al.* 2012b, SZAFRANSKA *et al.* 2008), miR-221 (BLOOMSTON *et al.* 2007, LEE *et al.* 2007, KAWAGUCHI *et al.* 20013) a miR-222 (BLOOMSTON *et al.* 2007, LEE *et al.* 2007, SZAFRANSKA *et al.* 2007, GREITHER *et al.* 2010, JAMIESON *et al.* 2012).

▪ Korelace s vývojem KP

V současné době bylo nalezeno několik miRNA, jejichž hladiny se prudce mění v průběhu rozvoje KP, respektive různých stádií PanIN (viz 2.2.3 Molekulární podstata karcinomu pankreatu) (HRUBAN *et al.* 2001). Významné změny hladin miRNA korelují zpravidla s pokročilejšími stádii – PanIN-2 a PanIN-3. Zvýšenou či sníženou expresi u vybraných miRNA korelujících s PanIN shrnuje Tab. 2.3.

Tab. 2.3. Příklady miRNA, jejichž exprese se mění s rostoucími stádii PanIN (↓ snížená či ↑ zvýšená exprese miRNA) .

miRNA	Hladina miRNA	Reference
let-7a	↑	DU RIEU <i>et al.</i> 2010
miR-10b	↑	XUE <i>et al.</i> 2013
miR-146a	↑	YU <i>et al.</i> 2012, XUE <i>et al.</i> 2013
miR-21	↑	DU RIEU <i>et al.</i> 2010, RYU <i>et al.</i> 2010, YU <i>et al.</i> 2012, XUE <i>et al.</i> 2013
miR-148a	↓	HANOUN <i>et al.</i> 2010
miR-155	↑	GIRONELLA <i>et al.</i> 2007, RYU <i>et al.</i> 2010, YU <i>et al.</i> 2012
miR-196a	↑	XUE <i>et al.</i> 2013
miR-196b	↑	YU <i>et al.</i> 2012, XUE <i>et al.</i> 2013
miR-217	↓	YU <i>et al.</i> 2012, XUE <i>et al.</i> 2013
miR-221	↑	DU RIEU <i>et al.</i> 2010
miR-222	↑	YU <i>et al.</i> 2012, DU RIEU <i>et al.</i> 2010

▪ Prognostické miRNA u karcinomu pankreatu

Odhad prognózy a odpovědi na léčbu má u KP obrovský význam. Pacienti s tímto onemocněním bývají často ve špatném zdravotním stavu a léčba nemívá výrazný účinek. Proto je třeba velmi důkladně zvažovat, zejména v případě neresekabilních lézí, zda zvolit chemoterapii či symptomatickou léčbu s ohledem na maximální možnou kvalitu života pacienta. Mnoho prací v oblasti KP a miRNA je proto právě zaměřeno na využití miRNA jako prognostických prediktorů. MiRNA, u kterých byly prokázány prognostické vlastnosti, jsou uvedeny v Tab. 2.4.

Tab. 2.4. Prognostické miRNA (↓ snižená, ↑ zvýšená exprese).

miRNA	Hladina miRNA u horší prognózy	Reference
let - 7g*	↓	SCHULTZ <i>et al.</i> 2012a
miR-7	↓	SINGH <i>et al.</i> 2013
miR-10b	↑	NAKATA <i>et al.</i> 2011, PREIS <i>et al.</i> 2011
miR-21	↑	GIOVANNETTI <i>et al.</i> 2010, HWANG <i>et al.</i> 2010, JAMIESON <i>et al.</i> 2012, PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-30d	↓	JAMIESON <i>et al.</i> 2012
miR-31	↓	PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-34a	↓	JAMIESON <i>et al.</i> 2012
miR-122	↓	PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-124	↓	WANG <i>et al.</i> 2009
miR-142- 5p	↑	OHUCHIDA <i>et al.</i> 2011
miR-145	↓	PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-146	↑	JI <i>et al.</i> 2009
	↓	PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-148a*	↓	SCHULTZ <i>et al.</i> 2012a
miR-155	↑	GREITHER <i>et al.</i> 2010, PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-187	↓	SCHULTZ <i>et al.</i> 2012a
miR-196a	↑	BLOOMSTON <i>et al.</i> 2007, KONG <i>et al.</i> 2011
miR-200c	↓	YU <i>et al.</i> 2010
miR-203	↑	GREITHER <i>et al.</i> 2010, IKENAGA <i>et al.</i> 2010
miR-205	↓	SINGH <i>et al.</i> 2013
miR-210	↑	GREITHER <i>et al.</i> 2010, PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-212	↑	SCHULTZ <i>et al.</i> 2012a
miR-218	↓	ZHU <i>et al.</i> 2014
miR-219	↑	BLOOMSTON <i>et al.</i> 2007
miR-221	↑	PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-222	↑	GREITHER <i>et al.</i> 2010, PAPACONSTANTINO <i>et al.</i> 2013
miR-675	↑	SCHULTZ <i>et al.</i> 2012a

2.3.3 Vliv miRNA na účinek léčby a možnosti terapie

Některé z diagnostických a prognostických miRNA hrají roli také v reakci na účinnost léčebných terapií a samy tak nabízejí nové terapeutické možnosti. Bylo například zjištěno, že nanomolární koncentrace oligonukleotidů komplementárních k miR-21 a miR-221 redukuje proliferaci nádorových buněčných linií pankreatu a spolu s působením gemcitabinu brání jejich růstu. MiR-21 je chemorezistentní k účinkům gemcitabinu, snižuje účinnost indukce apoptózy a zamezuje dalšímu růstu. Přidání inhibitorů fosfoinositid-3-kinázy a serin/threonin protein kinázy mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) regulujících mimo jiné buněčnou signalizaci, proliferaci, motilitu a proteinovou syntézu k buňkám, mělo za výsledek zamezení rezistence miR-21 (konkrétně pre-miR-21) a vedlo tedy k indukci apoptózy vlivem gemcitabinu. Cílení na miRNA lze například provést pomocí lentivirálních vektorů (typ retroviru), jak bylo popsáno na miR-21, kde inhibice jejími antagonisty vedla k zastavení růstu tumoru a k indukci apoptózy *in vitro* i *in vivo* (PARK *et al.* 2009, GIOVANNETTI *et al.* 2010, HWANG *et al.* 2010, SICARD *et al.* 2013).

Potencionální lék triptolide působí na pankreatickou nádorovou tkáň jako inhibitor proliferace a snižuje hladiny molekulárního chaperonu HSP70. Mechanismus jeho účinku je takový, že nepůsobí na HSP70 přímo, ale prostřednictvím zvyšování hladin miR-142-3p. Navozená exprese miR-142-3p u nádorů pankreatu způsobená účinkem ve vodě rozpustné formy prekursoru triplotide (minnelide) *in vivo*, snižuje expresi HSP70 jeho přímou vazbou na 3'UTR oblast transkriptu. Tato miRNA tedy snižuje proliferaci, způsobuje miR-142-3p indukovanou buněčnou smrt a proto může být použita jako vhodný cíl při léčebných terapiích KP (MACKENZIE *et al.* 2013).

Dalším terapeutickým cílem je proapoptická tumor supresorová miR-34a, která může potenciálně působit v sebeobnově a determinaci kmenových buněk nádoru pankreatu (JI *et al.* 2009) a zastavuje růst nádoru (KENT *et al.* 2009).

MiR-10a, miR-143 a miR-146a hrající důležitou roli v invazivitě a metastazování KP jsou rovněž potenciálním cílem nádorové terapie. MiR-10a suprimující *HOXA1*, *HOXB1* a *HOXB3* transkripční faktory cílí také na retinovou kyselinu. Použitím antagonistů receptoru retinové kyseliny nebo specifických inhibitorů, je kompletně zastaveno metastazování. Další možností je použití přírodních netoxických látek isoflavonů nebo DIM (3,3'-diinodolylmethan), které zvyšují expresi miR-146a a tímto i blokují invazivitu a metastazování buněk KP (WEISS *et al.* 2009, LI Y *et al.* 2010, HU *et al.* 2012).

2.4 Metody detekce exprese miRNA u karcinomu pankreatu

Pro úspěšnou analýzu miRNA a jejich hladin u KP je klíčový druh, kvalita a množství studovaného vzorku. Pro neinvazivní stanovení diagnózy a prognózy se z klinického hlediska jeví nejlépe vzorek séra. Zde je však hlavním problémem limitní množství přítomné miRNA a její specifita. Někteří navrhli možnosti diagnostiky ze séra pomocí miRNA a dalších molekulárních znaků nebo zjistili korelaci s prognózou sérových miRNA, přesto se v současné době opíráme spíše o výsledky získané ze zpracování vlastní pankreatické tkáně (DILLHOFF *et al.* 2008, HO *et al.* 2010, KONG *et al.* 2011, MORIMURA *et al.* 2011).

Pankreatickou tkáň lze běžně odebrat per-operačně nebo tenkojehlovou biopsií. Při resekci je odebráno větší množství tkáně, která je dlouhodobě uchovávána hlubokým zmražením nebo fixací. Pomocí histologického určení pak lze odebrat čistou nádorovou tkáň, což je v případě expresních analýz nezbytné. U většiny pacientů však není operace možná z důvodu pokročilého stádia KP, a proto jsou v rutinní klinické praxi dostupnější vzorky získané pomocí FNB. Výhodou EUS-FNB je, že se vzorky mohou odebírat i několikrát od téhož pacienta, a je tak možno sledovat průběh jeho onemocnění (více v 2.4.1 Problematika EUS-FNB). Přesto je v drtivé většině případů využíváno vzorků získaných při resekci tumoru. Srovnání různých typů vzorků je uvedeno v Tab. 2.5.

Tab. 2.5. Porovnání způsobu odběru vzorků k detekci miRNA u karcinomu slinivky.

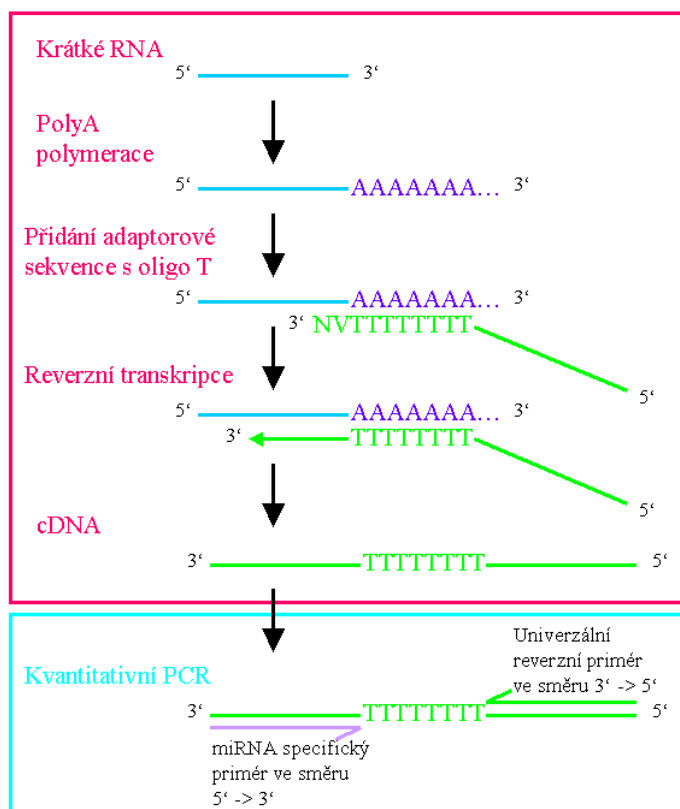
	Sérum	Tkáň získaná při FNB	Resekovaná tkáň
Invazivita	malá	střední	vysoká
Možná frekvence odběru	dny	dny - týdny	většinou žádný nebo pouze jeden odběr
Množství vzorku / cílové miRNA	dostatečné / velmi malé	malé / malé	dostatečné / dostatečné
Možnost získání čisté nádorové tkáně (buněk)	ne	ano (mikrodisekce)	ano (makrodisekce, mikrodisekce)

Z odebraného a případně fixovaného vzorku je izolována celková RNA, krátké RNA nebo miRNA s následným přepisem pomocí reverzní transkripce (RT). Protože jsou maturované miRNA velmi krátké a nemají na svém 3' konci polyA sekvenci, je postup RT miRNA rozdílný než při klasické RT mRNA (SHI a CHIANG 2005). Poté jsou nejčastěji voleny dva metodické přístupy. Při analýze velkého množství různých miRNA najednou je

používána mikro-čipová analýza na principu hybridizace s oligonukleotidy (miRNA microarray). Tato metoda má sice poměrně vysoké nároky na množství RNA a vyhodnocení získaných dat (Tab. 2.6), je však při ní možno získat informace o hladinách až tisíců miRNA v jedné analýze, což lze využít například při vyhledávání miRNA s aberantní expresí ve specifickém typu tkáně. Druhým přístupem je vyšetřování vybraných miRNA pomocí qRT-PCR (PCR v reálném čase po předchozí reverzní transkripci) s následnou normalizací pomocí referenčních genů (). Takto lze například měřit aberantní hladiny jednotlivých miRNA za účelem ověření souvislosti s prognózou, typem tkáně a podobně. Nejčastěji se k normalizaci využívá krátkých RNA, jako jsou U6 (MORIMURA *et al.* 2011, RYU *et al.* 2010, PREIS *et al.* 2011, JAMIESON *et al.* 2012, XUE *et al.* 2013), U44 (OHUCHIDA *et al.* 2011), 18S (LEE *et al.* 2007, GREITHER *et al.* 2010, PARK *et al.* 2011), setkáváme se také s normalizací pomocí některých miRNA, například miR-16 (WANG *et al.* 2009) a miR-54 (HO *et al.* 2010).

Tab. 2.6. Porovnání metody qRT-PCR a miRNA microarrays (upraveno podle MEYER *et al.* 2010).

	qRT-PCR	miRNA microarray
Princip	PCR amplifikace	Hybridizace
Doporučené množství RNA	10 - 700 ng	100 - 10 000 ng
Limit detekce	10 - 22 mol	10 - 18 mol
Zpracování dat	1 den	více než dva dny



Obr. 2.8. Schématické znázornění průběhu reverzní transkripce krátkých RNA a následné kvantitativní PCR. Na 3' konec vyzolované RNA je nejdříve připojen polyA konec pomocí polyA polymerázy. Následuje připojení adaptorové sekvence s oligoT a nukleotidů V (A, G nebo C) a N (A, T, G nebo C) (směr 5'→3'). Přidáním reverzní transkriptázy dochází k reverzní transkripci. Vnesením adaptorové sekvence do cDNA má každá přepsaná RNA univerzální sekvenci na svém 5' konci. Použitím priméru nasedajícího v oblasti univerzální sekvence cDNA při následující kvantitativní PCR je zajištěna specifita amplifikace cDNA fragmentů. Jedná se o reverzní primér - sekvenci oligonukleotidů shodnou se sekvencí adaptoru. Pro kvantifikaci specifické miRNA je tedy sekvence druhého priméru shodná se sekvencí miRNA.

2.4.1 Problematika EUS-FNB

Jak již bylo popsáno výše, odběr vzorku pomocí EUS-FNB je výhodný z důvodu dostupnosti pro všechny pacienty bez ohledu na stádium jejich onemocnění, možnosti opakovaného odběru a nižší invazivity v porovnání s resekci tumoru. Navíc následné zdravotní komplikace jsou u pacientů velmi vzácné (ELOUBEIDI *et al.* 2003). Přes všechny tyto výhody existuje na světě jen několik málo pracovišť, které tyto druhy vzorků využívají pro analýzu molekulárních znaků, ať už na úrovni DNA nebo exprese RNA. Důvodů je hned několik (viz dále).

▪ Odlišení nádorové od zánětlivé tkáně u vzorků EUS-FNB

EUS-FNB je velmi přesnou metodou pro diagnostiku pacientů s podezřením na KP, zvláště pokud ostatní diagnostické metody selhaly. Citlivost EUS-FNB je 84 %, specifita až 97 %. Nevýhodou je poměrně nízká negativní predikční hodnota, která se pohybuje okolo 50 - 60 % (tzn. jak velká je pravděpodobnost, že pacienti s negativním výsledkem z EUS opravdu nemají KP). Navíc až u 20 % případů nelze stále diagnózu určit. Velmi často je nádorová tkáň zaměňována s ložiskem zánětu, kterým může být ohraničena (ELOUBEIDI *et al.* 2003, BOURNET *et al.* 2011).

Pro potvrzení či určení diagnózy je poté odebraná tkáň posuzována cytologem a případně také histologem. Zde však dochází k dalším problémům s určením diagnózy. V případě KP se spolu s nádorem mění i celý charakter pankreatu. Dokonce i nenádorové buňky pankreatu mění svou morfologii, jsou v různém stádiu diferenciaci a ve zvýšené míře exprimují řadu signálních molekul. Tkáň pankreatu je vlivem nádoru prostoupena rozsáhlou fibrózou a v okolí nádoru i v ostatních částech pankreatu se často vyskytují zánětlivá ložiska. Tyto změny jsou zaměnitelné s chronickou pankreatitidou nebo jiným typem benigního zánětu. Z těchto důvodů patří tkáň pankreatu k nejnáročnějším typům vzorků z hlediska patologické interpretace nálezu. V případě fixovaných vzorků po resekci lze histologicky ohraničit ložisko nádoru od okolní zánětlivé tkáně a získat tak pro další analýzy čistou nádorovou tkáň. U nativních vzorků z EUS-FNB a zmražených tkání pankreatu je to však téměř nemožné. Navíc jsou vzorky z EUS-FNB tak malé, že mnohdy pro histologické určení ani nestačí. Výsledky cytologie jsou v těchto případech také často nejednoznačné a při cytologickém vyšetření nelze ohraničit ložisko nádoru (HEZEL *et al.* 2006, KLÖPPEL a ADSEY 2009).

Pro získání čisté nádorové tkáně pomocí EUS-FNB jsou kladeny vysoké nároky na zručnost a zkušenosti lékaře, který odběr provádí. Riziko odebrání neúplně nádorové tkáně je touto technikou vysoké z důvodu nerozpoznání přesného charakteru tkáně nebo vlivem průchodu jehly přes části slinivky, které ohraničují nádor. V případě nejasného výsledku cytologie a nemožnosti histologicky ověřit přítomnost a případnou lokalizaci ložiska nádoru ve vzorku, nelze určit, zda se jedná o vzorek pocházející z KP nebo zánětu.

Diagnostiku lze upřesnit analýzou molekulárních znaků, případně v kombinaci s výsledky cytologie. Úpravou izolačních postupů pro tkáň pankreatu lze i z velmi malých vzorků FNB vyizolovat dostatek DNA pro detekci mutací, jako například pro detekci mutací v genu *KRAS*. Metoda detekce mutací musí být dostatečně citlivá, aby zachytila i nepatrné množství mutované frakce. Přítomná mutace v *KRAS* není sice dostačující k určení přesného

složení vzorku, avšak poukazuje (specifita 100 %) na přítomnost nádorových buněk, jak bylo zjištěno u resekovaných vzorků KP (TADA *et al.* 2002, TAKAHASHI *et al.* 2005, SALEK *et al.* 2007, BOURNET *et al.* 2009). Předchozí výzkumy naší laboratoře navrhly kombinaci detekce mutací v *KRAS* se ztrátami heterozygosity tumor supresorů *CDKN2A* a *DPC4* vedoucí ke zvýšení citlivosti metody diferenciální diagnostiky KP a CHP (SALEK *et al.* 2007). Jiná práce nabízí možnost diferenciální diagnostiky pomocí analýzy epigenetického umlčení miR-148a způsobeného hypermethyloací promotorové oblasti genu této miRNA (HANOUN *et al.* 2010).

▪ Analýza exprese miRNA ze vzorků EUS-FNB

Tkáň pankreatu obsahuje velké množství enzymů a nukleáz, které ztěžují izolaci nukleových kyselin (NK) a způsobují jejich předčasnou degradaci. Kvalitu a množství NK lze ovlivnit fixací, hlubokým zmražením nebo vložením tkáně do stabilizačního roztoku ihned po jejím odběru a úpravou izolačních postupů. Nádorová tkáň obsahuje nukleáz o něco méně, přesto však problémy s izolací NK přetrvávají a dochází k jejich nadměrné degradaci. Vzhledem k množství získaného vzorku je ovlivněn i výtěžek NK. Výtěžek RNA je mnohdy tak malý, že nelze pokračovat v dalších analýzách. V případě izolace miRNA je sice obava z jejich degradace zanedbatelná vzhledem k jejich délce, avšak jejich výtěžky také nejsou vysoké. Málokterá laboratoř je proto schopna miRNA z tohoto typu vzorku vyizolovat v dostatečném množství (SZAFRANSKA *et al.* 2008, BOURNET *et al.* 2011).

Vzhledem k výše popsané problematice nemožnosti určení přesnějšího zastoupení nádorových buněk, nastává u analýz exprese miRNA, ale také dalších RNA, problém. U vzorků je sice změřena relativní hladina miRNA, ale neví se, kolika nádorovými buňkami je jejich abnormální exprese způsobena, což může vést k nesprávné interpretaci výsledků.

Není proto divu, že tento ač výhodný, avšak problematický způsob detekce exprese miRNA je světovým unikátem. Byly nalezeny pouze čtyři laboratoře, které se zabývají kvantifikací miRNA ze vzorků EUS-FNB (SZAFRANSKA *et al.* 2008, TORRISANI *et al.* 2009, PREIS *et al.* 2011, ALI *et al.* 2012, BRAND *et al.* 2014).

První z uvedených studií ukázala, že lze kvantifikovat miRNA z EUS-FNB pomocí qRT-PCR. I přesto, že do této pilotní studie bylo zahrnuto pouze 14 vzorků určených na základě cytologického vyšetření, bylo ukázáno, že lze odlišit maligní od benigní tkáně pomocí analýzy exprese miR-217 spolu s miR-196a (SZAFRANSKA *et al.* 2008). Stejná laboratoř

poměrně nedávno publikovala další studii, ve které prokázala diagnostický význam pěti vybraných miRNA na skupině 228 vzorků (BRAND *et al.* 2014).

Další studie prokázala na podskupině 12 vzorků snížené exprese let-7 u PDAC, ale také neřešila zastoupení nádorových buněk ve vzorku (TORRISANI *et al.* 2009).

Poměrně vyšší počet vzorků EUS-FNB, a to konkrétně 41, byl využit v další studii. Zde byly vzorky fixovány a určeny pomocí histologie. Nakonec bylo použito 23 vzorků KP, které obsahovaly více než 50 nádorových buněk, a 12 vzorků benigní tkáně. Pomocí hybridizace na čipu bylo zjištěno 228 miRNA, které byly aberantně exprimovány ve vzorcích KP. Poté byla u 7 miRNA tato exprese potvrzena pomocí qRT-PCR (ALI *et al.* 2012).

Na důležitost určení přesného charakteru buněk ve vzorku upozornila jediná studie. Jejím cílem bylo posoudit prostorové exprese miRNA v KP a určit, zda jsou změny v expresi jednotlivých miRNA specifické pouze pro buňky nádoru nebo jsou přítomny i u jiných typů buněk v okolí nádoru. Bylo využito kombinované ISH (*fluorescence based In Situ Hybridization*) oligonukleotidů miRNA s IHC (*ImunoHistoChemistry*) barvením specifických proteinů. Do studie bylo zařazeno 95 pacientů s PDAC potvrzeného pomocí EUS a 11 kontrolních pacientů. Vybraná kandidátní miRNA – miR-10b - vykazovala vyšší expresi u maligní tkáně, u pacientů ve stádiu I a II vykazovala nižší exprese než v pozdějších stádiích a prokázala tedy korelaci s prognózou. Bylo zjištěno, že použitím této metody lze velmi dobře rozlišit benigní od maligní tkáně, zvýšit diagnostickou přesnost EUS-FNB a stanovit prognózu (PREIS *et al.* 2011). Tato metoda kvantifikace miRNA nemá však příliš velký potenciál pro využití v klinické praxi.

Bohužel i přes současné pokroky v metodách molekulární biologie nebyla stále publikována studie, která by dokázala spolehlivě odlišit maligní tkáň pankreatu ze vzorků FNB, našla významné prognostické miRNA a byla použitelná v klinické praxi.

2.5 Vyšetřované molekulární znaky

2.5.1 MiR-21-5p

Mezi nejčastěji studované miRNA v souvislosti s KP patří miR-21. MiR-21 je kódována samostatným genem *MIR21* lokalizovaným na dlouhém raménku chromozomu číslo 17. Pre-miR-21 je dlouhá 72 nukleotidů a samotná maturovaná forma má 22 nukleotidů. Tato miRNA byla jednou z prvních identifikovaných savčích miRNA a je silně evolučně konzervovaná (www.mirbase.org).

Jak již bylo popsáno v předchozích kapitolách, miR-21 je spojována s procesy vedoucí k maligní transformaci u KP. MiR-21 ovlivňuje proliferaci, frekvenci dělení, migraci a invazi nádorových buněk (PARK *et al.* 2009). Tato miRNA je také velmi často předmětem studia expresí u KP, kdy se uvádí, že je exprimována ve zvýšené hladině oproti zdravé tkáni nebo CHP (BLOOMSTON *et al.* 2007, LEE *et al.* 2007, DILLHOFF *et al.* 2008, WANG *et al.* 2009, PREIS *et al.* 2011, BAUER *et al.* 2012, JAMIESON *et al.* 2012, LIU R. *et al.* 2012, FRAMPTON *et al.* 2014). Objevují se práce, které spojují zvýšenou expresi miR-21 s rozvojem PanIN (DU RIEU *et al.* 2010, YU *et al.* 2012, XUE *et al.* 2013). V neposlední řadě se tato miRNA zdá být důležitým prognostickým znakem (GIOVANNETTI *et al.* 2010, HWANG *et al.* 2010, JAMIESON *et al.* 2012, PAPACONSTANTINO *et al.* 2013). V souvislosti s miR-21 se velmi často hovoří o jejím využití v terapii KP, protože je chemorezistentní k účinkům gemcitabinu, snižuje účinnost indukce apoptózy a zamezuje dalšímu růstu nádorových buněk (GIOVANNETTI *et al.* 2010, HWANG *et al.* 2010).

2.5.2 MiR-10b-5p

MiR-10b patří do RNA genové rodiny *miR-10* spolu s miR-10a, miR-51, miR-57, miR-99 a miR-100. Gen pro miR-10b je u člověka lokalizován na 2. chromozomu, její prekurzorová struktura je dlouhá 110 nukleotidů a její maturovaná forma sestává z 22 nukleotidů (www.mirbase.org).

Bylo zjištěno, že tato miRNA je rozdílně exprimována v různých typech tkání pankreatu. V nádorové tkáni se vyskytuje ve vyšších hladinách než u CHP nebo u zdravé tkáně (BLOOMSTON *et al.* 2007, PREIS *et al.* 2011, NAKATA *et al.* 2011). Její exprese je také zvýšená u CHP v porovnání s normální tkání (BLOOMSTON *et al.* 2007). MiR-10b je spojována rovněž s PanIN, kdy se ve stádiích PanIN-2 a PanIN-3 projevují její výrazně zvýšené exprese (XUE *et al.* 2013). Se zvyšující se expresí miR-10b byla pozorována horší prognóza u pacientů s KP (PREIS *et al.* 2011, NAKATA *et al.* 2011).

2.5.3 Referenční gen U6 (RNU6b)

U6 je malá nekódující jaderná RNA (snRNA), která se účastní sestřihu spolu s malými jadernými ribonukleoproteiny (snRNP). Její sekvence je vysoce konzervovaná a v genomu obratlovců se nachází v mnoha kopiích (BROW a GUTHRIE 1988). Jednou z těchto kopií je u člověka i RNU6b (také *RNU6-2*, *RNA*, *U6 small nuclear 2*) lokalizovaná

na chromozomu 10. RNU6b vytváří 107 bp dlouhý transkript, který se nepřekládá v protein (www.ensembl.org).

RNU6b patří mezi tzv. “*house-keeping gene*“. Tyto geny jsou potřebné pro zachování základních buněčných funkcí nezbytných pro existenci buňky, a proto se předpokládá jejich stabilní exprese ve všech buňkách organismu bez závislosti na typu tkáně, vývojovém stádiu, buněčném cyklu či vnějších signálech. *House-keeping* geny se proto široce využívají jako tzv. endogenní kontroly nebo referenční geny, a to zejména při analýzách expresí RNA.

Studie, která analyzovala 38 různých lidských tkání (včetně pankreatu) a 60 nádorových linií, potvrdila, že RNU6b je v těchto vzorcích stabilně exprimován a doporučila jej tedy jako vhodný referenční gen (APPLIED BIOSYSTEMS 2010). Protože je transkript RNU6b relativně krátký, velmi často se uplatňuje při analýzách hladin miRNA, které se pomocí něj normalizují, nevýjimaje studií zabývajících se miRNA u KP (MORIMURA *et al.* 2011, RYU *et al.* 2010, PREIS *et al.* 2011, JAMIESON *et al.* 2012, XUE *et al.* 2013).

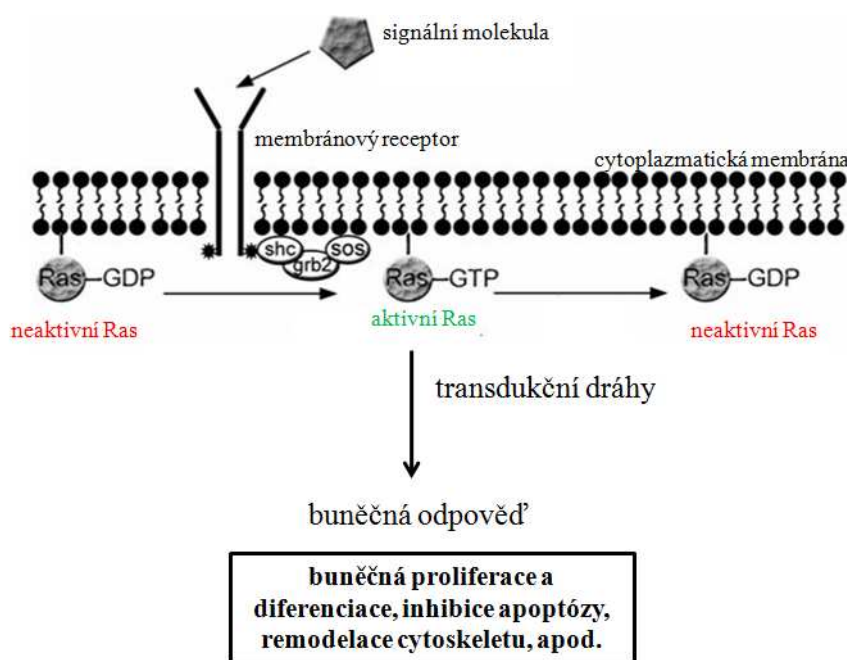
2.5.4 Gen *KRAS*

Gen *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) je u člověka lokalizován na krátkém raménku chromozomu 12, zahrnuje úsek přibližně 45 kbp a obsahuje 6 exonů. *KRAS* hraje velmi důležitou roli v procesu buněčné signalizace. Protein Ras, jenž je produktem tohoto genu, je lokalizován na vnitřní straně plazmatické membrány a patří mezi malé G proteiny. Jeho funkcí je tedy vázat GTP, kterým se zároveň aktivuje. V neaktivním stavu se vyskytuje s navázaným GDP.

Fyziologické aktivaci Ras (Obr. 2.9) předchází přenos signálu signální molekulou přes membránový receptor a pomocné proteiny. Signální molekula (například cytokin) se naváže na specifický membránový receptor, čímž dojde k jeho autofosforylaci a dimerizaci. Tímto receptor následně váže pomocné proteiny Shc1 (*SHC-transforming protein 1*), Grb2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) a Sos (*Son Of Sevenless*). Sos patří mezi GEF proteiny (*Guanine Exchange Factor*) a navázáním na protein Ras indukuje jeho konformační změnu, kdy dojde k uvolnění GDP a vazbě GTP. Aktivní Ras-GTP poté předává signál dále, například MAPK kaskádou (*Mitogen Activated Protein Kinase cascade*), nebo dráhou zprostředkovanou fosfatidylinositol-3-kinázou či Ral proteiny (*Ras-Like proteins*). Po předání signálu dojde opět k hydrolýze GTP na GDP pomocí GAPs proteinů (*GTPase Activating Proteins*) a Ras je inaktivován (BENEŠOVÁ 2007).

Za patologických okolností, tedy například v případě mutace v genu *KRAS* (ve většině případů se jedná o bodové mutace v kodonech 12 a 13 exonu 2 nebo méně často v kodonu 61 exonu 3), je Ras permanentně aktivovaný (Ras-GTP). Normální proces buněčné signalizace je tímto narušen a dochází ke zvýšené proliferaci, například blokováním apoptózy a podporou angiogeneze (BENEŠOVÁ 2007, LING *et al.* 2012).

Somatické mutace v protoonkogenu *KRAS* se vyskytují u více než 70 % duktálních adenokarcinomů pankreatu (ALMOGUERA *et al.* 1988, SALEK *et al.* 2007, SALEK *et al.* 2009, www.cancer.sanger.ac.uk/cosmic).



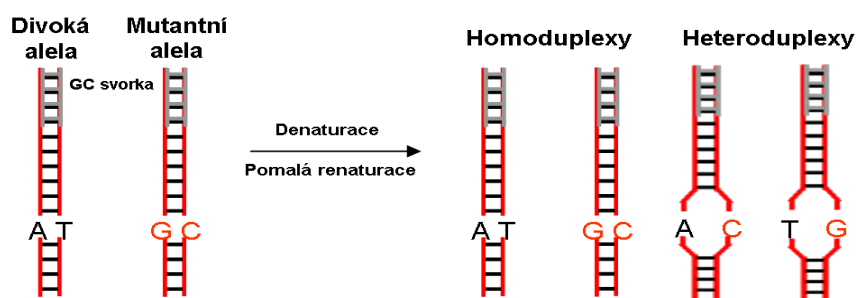
Obr. 2.9. Aktivace proteinu Ras vedoucí k buněčné odpovědi (upraveno podle BENEŠOVÁ 2007).

▪ Detekce mutací v *KRAS* analýzou heteroduplexů

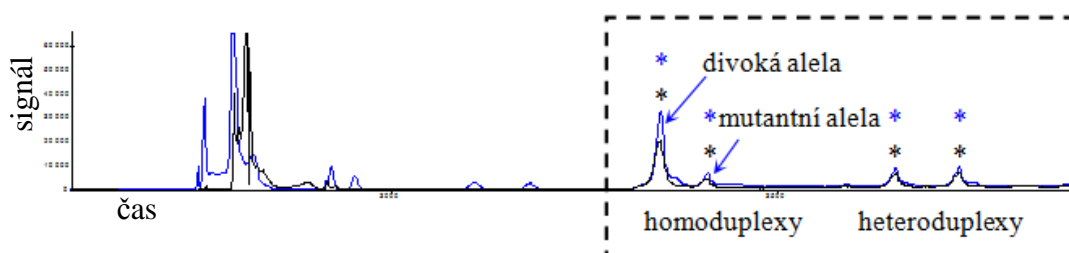
Pro detekci bodových mutací je využíváno mnoha metod (například DNA sekvenování nebo metod rozlišujících mutované a nemutované formy PCR amplifikátů). Citlivou a přesnou metodou je analýza heteroduplexů pomocí denaturační kapilární elektroforézy (DCE, *Denaturing Capillary Electrophoresis*).

Heteroduplexová analýza umožňuje detekci mutací ve vzorku s předchozí amplifikací daného úseku. Každý amplifikovaný fragment nese primérem zanesenou fluorescenční značku a tzv. GC svorku, která zajistí, že fragmenty nebudou při DCE zcela rozděleny. Speciální teplotní program v cykléru nejdříve amplifikované fragmenty divokých a mutantních alel denaturuje vysokou teplotou a následně postupným ochlazováním teploty

fragментu renaturuje za vzniku homoduplexů a heteroduplexů (Obr. 2.10). Vytvořená směs homoduplexů a heteroduplexů je následně analyzována pomocí DCE. DCE slouží k separaci fragmentů DNA s jejich částečnou denaturací s použitím běžného genetického analyzátoru (DNA sekvenátoru). Principem detekce fragmentů je jejich pohyb v kapiláře v prostředí gelu, kdy jsou vystaveny elektrickému poli a pohybují se ke kladnému pólu v závislosti na své délce (delší fragmenty se pohybují pomaleji) a konformaci. Nejprve jsou pomocí laseru detekovány homoduplexy a následně heteroduplexy, které se gelem pohybují pomaleji, a to vlivem jejich nekomplementární části. Přesné pořadí homoduplexů závisí na druhu divokého a mutantního typu (například GC páry jsou více stabilní, a proto se tyto fragmenty detekují dříve). V případě, že vzorek neobsahuje mutované fragmenty, je detekován pouze jeden fragment divoké alely. Výhodou této metody je to, že lze zachytit i malé procento mutované frakce. Další výhodou je možnost kvalifikovat i kvantifikovat mutovanou frakci. Kvalitativně toho lze docílit směsí vzorku s kontrolní směsí o známém typu mutace, kdy je vzorek a kontrola značená jinou fluorescenční značkou (Obr. 2.11).



Obr. 2.10. Znázornění tvorby heteroduplexů.



Obr. 2.11. Elektroforegram: detekce mutací v genu *KRAS* pomocí heteroduplexní analýzy. Vzorek je značený 6-karboxyfluoresceinem (FAM) (modrá), kontrola je značená karboxymethylrhodaminem (TAMRA) (černá). Analýza prokázala mutaci v genu *KRAS*, kdy se jednalo o stejný typ mutace, jako je použit v kontrolním PCR produktu.

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce byla optimalizace laboratorního postupu pro kvantifikaci miRNA u vzorků získaných pomocí EUS-FNB za účelem zpřesnění diagnostiky a odhadu prognózy karcinomu pankreatu.

Dílčí cíle:

1. Optimalizovat izolaci NK ze vzorků EUS-FNB.
2. Optimalizovat postup reverzní transkripce a qPCR.
3. Stanovit účinnost a zjistit specifitu primérů pro qPCR miR-21 a miR-10b a referenčního genu RNU6b.
4. Ověřit optimalizované laboratorní postupy pro izolaci NK na skupině 110 vzorků.
5. Analyzovat mutace v genu *KRAS* u 110 vzorků za účelem potvrzení diagnózy a odhadu zastoupení nádorových buněk ve vzorku.
6. Ověřit optimalizované laboratorní postupy pro kvantifikaci RNU6b, miR-21 a miR-10b pomocí qRT-PCR u vzorků s nalezenou mutací v *KRAS*.
7. Navrhnout řešení pro kvantifikaci miRNA s ohledem na zastoupení nádorových buněk ve vzorku.

4 Materiál a metodika

4.1 Pacienti

Do studie bylo zařazeno celkem 110 pacientů s podezřením na KP. Ti byli vyšetřeni v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici v Praze (ÚVN) na Oddělení gastrointestinální endoskopie. Vyšetření probíhalo pomocí EUS se současnou biopsií tenkou jehlou potenciálně nádorové tkáně. Dále byl získán informovaný souhlas pacienta s využitím vzorku pro vědecké účely a shromažďována další klinická data (Tab. 4.1). Žádný z pacientů nebyl před odběrem vzorku léčen ani operován. Diagnóza byla stanovena lékařem v kombinaci s cytologickým vyšetřením.

Tab. 4.1. Klinikopatologická charakteristika pacientů.

Počet pacientů		110
Průměrný věk		68 let
Počet pacientů (procento z celkového počtu 110 pacientů)		
Pohlaví	ženy	58 (53 %)
	muži	52 (47 %)
Diagnóza	CHP	16 (15 %)
	nestanovena	9 (8 %)
	KP (PDAC)	85 (77 %)
Počet pacientů (procento z celkového počtu 85 pacientů s diagnózou KP)		
Stádium onemocnění	IIA	4 (5 %)
	IIB	8 (9 %)
	III	38 (45 %)
	IV	35 (41 %)
Lokalizace tumoru	hlava pankreatu	60 (71 %)
	tělo pankreatu	18 (21 %)
	ocas pankreatu	7 (8 %)

4.2 Odběr a uchovávání vzorků

Chemikálie:

RNAlater® (Sigma-Aldrich, USA)

Bezprostředně po vyšetření pacienta byl získaný vzorek vložen do sterilní 2ml mikrozkrumavky, která obsahovala 1,5 ml RNAlater zabraňujícího degradaci vzorku RNázami. Každému vzorku bylo poté v naší laboratoři přiděleno pracovní označení SL a pořadové číslo. Vzorky jsem dlouhodobě skladovala při –20 °C.

4.3 Izolace RNA

Přístroje:

Sterilní box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)

Digitální tepelný blok s regulací času a teploty (VWR, USA)

Minitřepačka UV3 (VWR, USA)

Centrifuga 2416 s regulací času a otáček, 24 x 2ml mikrozkušavka (Eppendorf, Německo)

Před samotnou izolací RNA jsem rozmražené biotické vzorky přemístila do sterilní 1,5ml mikrozkušavky s víčkem. Přidávání všech roztoků a manipulaci se vzorkem jsem prováděla pomocí sterilních špiček s filtrem v prostředí sterilního boxu. Kvantifikace RNA byla prováděna pomocí fluorometrie Mgr. Terejou Hálkovou. Vyizolovanou RNA jsem uchovávala při -80 °C.

4.3.1 Izolace celkové RNA soupravou RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit

Chemikálie:

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion®, USA)

- Digestion Buffer (pomocný pufr ke štěpení proteázou)
- Protease (proteáza)
- Isolation Additive (izolační aditivum)
- Wash I Buffer (promývací pufr 1)
- Wash 2/3 Buffer (promývací pufr 2/3)
- DNase (DNáza)
- DNase Buffer (DNázový pufr)

Bezvodý ethanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Nejdříve jsem k biotickému vzorku přidala 100 µl pomocného pufru a 4 µl proteázy. Tuto směs jsem promíchala pipetou a inkubovala 15 minut při 50 °C a přesně 15 minut při 80 °C. Následně jsem přidala 120 µl izolačního aditiva a 275 µl ethanolu. Lyzát jsem pečlivě promíchala pipetou. 100 µl lyzátu jsem poté napipetovala do sterilní 1,5ml mikrozkušavky s víčkem pro následnou izolaci DNA (viz 4.4 Izolace DNA) a zbytek lyzátu aplikovala na kolonku umístěnou ve sběrné zkumavce. Lyzát jsem

centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g. Obsah sběrné zkumavky jsem odstranila. Na kolonku jsem aplikovala 700 µl promývacího pufru 1 a centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g. Následně jsem odstranila obsah sběrné zkumavky. Dále jsem na kolonku napipetovala 500 µl promývacího pufru 2/3, centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g a obsah sběrné zkumavky odstranila. Znovu jsem na kolonku napipetovala 500 µl promývacího pufru 2/3, centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g a obsah sběrné zkumavky odstranila. Kolonku jsem následně ještě jednou centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g. Poté jsem si připravila ve sterilní 1,5ml mikrozskumavce DNázovou směs složenou z 50 µl vody, 4 µl DNázy a 6 µl DNázového pufru pro jeden vzorek. 60 µl promíchané a krátce centrifugované DNázové směsi jsem aplikovala na kolonku a inkubovala při teplotě 25 °C po dobu 30 minut. Po uplynulé inkubaci DNázy na kolonce jsem na kolonku aplikovala 700 µl promývacího pufru 1 a centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g a poté odstranila obsah sběrné zkumavky. Dále jsem na kolonku napipetovala 500 µl promývacího pufru 2/3, centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g a obsah sběrné zkumavky odstranila. Znovu jsem na kolonku napipetovala 500 µl promývacího pufru 2/3, centrifugovala 30 sekund při 10 000 x g a obsah sběrné zkumavky odstranila. Kolonku jsem ještě jednou centrifugovala 1 minutu při 10 000 x g. Nakonec jsem kolonku přemístila do sterilní 1,5ml mikrozskumavky pro závěrečnou eluci RNA. Do kolonky jsem přidala 60 µl PCR vody a centrifugovala 1 minutu při 13 000 x g.

4.3.2 Izolace RNA v rámci optimalizačních kroků

V rámci optimalizace jsem rozdělovala vzorky na dva nebo tři stejné díly a následně izolovala RNA vybranou soupravou pro každý díl vzorku.

▪ **Izolace celkové RNA soupravou NucleoSpin totalRNA FFPE**

Chemikálie:

NucleoSpin® totalRNA FFPE (Machery-Nagel, Německo)

- Lysis Buffer FL (lyzační pufr)
- Proteinase k (proteináza K)
- Decrosslinking Buffer (D-link pufr)
- MDB Buffer (pufr pro odstranění solí)
- rDNase (DNáza)
- DNase Reaction Buffer (DNázový reakční pufr)
- FW1 Buffer (promývací pufr 1)
- FW2 Buffer (promývací pufr 2)

Bezvodý ethanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Izolační postup byl u použití této soupravy obdobný jako u soupravy RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (kapitola 4.3.1) s drobnými odchylkami v inkubačních časech, teplotách a podmínkách centrifugací. Nejdříve jsem tedy tkáň rozložila inkubací se speciálními pufrů a proteinázou K, následně jsem NK vysrážela ethanol. Poté jsem odebrala 100 µl lyzátu pro izolaci DNA a zbytek lyzátu aplikovala na kolonku. Po promytí kolonky jsem na membránu aplikovala DNázu a inkubovala. Poté jsem kolonku promývala pufrů a nakonec jsem eluovala RNA do 20 µl PCR vody.

▪ **Izolace celkové RNA soupravou mirPremier microRNA Isolation Kit**

Chemikálie:

mirPremier® microRNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich, USA)

- Lysis Solution (lyzační roztok)
- Binding Solution (roztok pro navázání na membránu kolonky)
- Wash Solution 2 Concentrate (promývací roztok)

2-mercaptoethanol (14.3 M (pure liquid)) (Sigma-Aldrich, USA)

Bezvodý ethanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Ve srovnání s izolačním postupem u soupravy RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (kapitola 4.3.1) byl postup izolace touto soupravou rozdílný ve způsobu rozrušení tkáně (speciální roztok s 2-merkaptoethanolem a homogenizace), způsobu odstranění DNA ze vzorku (vysrážení z roztoku speciálními pufrů) a inkubačních a centrifugačních podmínkách, avšak principiálně se také jednalo o zachycení RNA na membránu kolonky s následným promýváním a závěrečnou elucí vodou. Před aplikací na kolonku jsem si odebrala 100 µl lyzátu pro izolaci DNA. RNA jsem eluovala do 75 µl PCR vody.

▪ **Izolace malých RNA soupravou mirPremier microRNA Isolation Kit**

Chemikálie:

mirPremier® microRNA Isolation Kit (Sigma-Aldrich, USA)

- microRNA Lysis Buffer (lyzační roztok)
- Binding Solution (roztok pro navázání na membránu kolonky)
- Wash Solution 2 Concentrate (promývací roztok)

2-merkaptoethanol (14.3 M (pure liquid)) (Sigma-Aldrich, USA)

Bezvodý ethanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Ve srovnání s izolačním postupem u soupravy RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (kapitola 4.3.1) byl postup izolace touto soupravou rozdílný ve způsobu rozrušení tkáně (speciální roztok s 2-merkaptoethanolem a homogenizace), způsobu odstranění DNA ze vzorku (díky použití speciálních pufrů se NK delší než 200 nukleotidů nezachytí na membránu kolonky) a inkubačních a centrifugačních podmínkách, avšak principiálně se také jednalo o zachycení RNA na membránu kolonky s následným promýváním a závěrečnou elucí vodou. Před aplikací na kolonku jsem si odebrala 100 µl lyzátu pro izolaci DNA. RNA jsem eluovala do 25 µl PCR vody.

4.4 Izolace DNA

Přístroje:

Biohazardní laminární box (Merci Biohazard, Francie)

Digitální tepelný blok s regulací času a teploty (VWR, USA)

Minitřepačka UV3 (VWR, USA)

Centrifuga 2416 s regulací času a otáček, 24 x 2ml mikrozkušavka (Eppendorf, Německo)

Chemikálie:

JETQUICK Tissue DNA Spin Kit (Genomed, ČR)

- Proteinase K (proteináza K)
- T1 Buffer (lyzační pufr T1)
- T2 Buffer (lyzační pufr T2)
- TX Buffer (promývací pufr TX)
- T3 Buffer (promývací pufr T3)

Bezvodý ethanol (Dr. Kulich Pharma, ČR)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

DNA jsem izolovala ve sterilním boxu ze 100 µl lyzátu (viz 4.3 Izolace RNA). K lyzátu jsem přidala sterilní špičkou s filtrem nejdříve 200 µl lyzačního pufru T1 a poté 25 µl proteinázy K. Směs jsem pečlivě promíchala a inkubovala 1 - 2 hodiny při 56 °C. Poté jsem přidala sterilní špičkou s filtrem 200 µl lyzačního pufru T2, směs jsem promíchala a inkubovala 10 minut při 70 °C. Zkušavky jsem vložila do chladicího stojánu, přidala špičkou s filtrem 200 µl bezvodého ethanolu ochlazeného na teplotu -20 °C a roztok ihned důkladně promíchala. Poté jsem roztok pomocí sterilní špičky s filtrem převedla na kolonku se sběrnou zkušavkou a centrifugovala 1 minutu při 10 000 x g. Obsah sběrné zkušavky jsem odstranila a na kolonku napipetovala sterilní špičkou bez filtru 500 µl promývacího pufru TX s následnou centrifugací 1 minutu při 10 000 x g. Obsah sběrné zkušavky jsem opět odstranila a na kolonku napipetovala sterilní špičkou bez filtru 500 µl promývacího pufru T3 s následnou centrifugací při stejných podmínkách. Obsah sběrné zkušavky jsem opět odstranila a znovu vložila pod kolonku. Následovala dvouminutová centrifugace při 13 000 x g. Kolonku jsem vložila do sterilní 1,5ml mikrozkušavky s víčkem.

Na střed kolonky jsem napipetovala sterilní špičkou s filtrem 40 μ l 70°C PCR vody a inkubovala 1 minutu při laboratorní teplotě. Zkumavku s kolonkou jsem poté centrifugovala 2 minuty při 10 000 x g, čímž jsem do vody eluovala DNA. DNA jsem kvalitativně ověřila horizontální gelovou elektroforézou (viz dále). Kvantifikace byla prováděna fluorometricky Mgr. Terezou Hálkovou. DNA jsem dlouhodobě skladovala při -20 °C.

4.5 Horizontální gelová elektroforéza v agarózovém gelu

Přístroje:

Elektrický vaříč (Lavát, ČR)

Sestava pro agarózovou elektroforézu - Elite 300 Plus (Wealtec, USA)

UVP lampa se čtecím a úložným zařízením (BioPoc-ITTM, Velká Británie)

Chemikálie:

Agarose DNA Grade Electran® for electrophoresis (agaróza) (VWR, USA)

Tris-Borate-EDTA buffer (TBE pufr) (89mM Tris-borate a 2mM EDTA, pH 8.3) (Sigma-Aldrich, USA)

Ethidium bromid (10 mg·ml⁻¹) PCR ethidium bromid^{TB} (Top-Bio, ČR)

GeneRuller 50 bp DNA ladder (velikostní standard) (Thermo Scientific, USA)

GeneRuller 100 bp DNA ladder (velikostní standard) (Thermo Scientific, USA)

6x DNA Loading Dye (vkládací pufr) (10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60mM EDTA) (Thermo Scientific, USA)

Pro přípravu 1 % agarózového gelu jsem nejdříve smíchala 25 ml 20x zředěného TBE pufru s 250 mg agarózy. Tuto směs jsem přivedla k varu a ochladila na přibližně 70 °C. Do rozpuštěné agarózy jsem poté napipetovala 5 μ l ethidium bromidu a směs nalila do elektroforetické vany. Nakonec jsem do elektroforetické vany vložila hřebeny a nechala agarózu ztuhnout při 4 °C po dobu asi 20 minut. Z připraveného agarózového gelu jsem poté vyjmula hřebeny, čímž jsem si vytvořila jamky pro aplikaci vzorku. Gel jsem nakonec přelila zředěným TBE pufrem tak, aby byl celý ponořen a byly ponořeny také elektrody.

3 μ l vzorku jsem nejdříve ředila 2 μ l vkládacího pufru. Součástí každé elektroforézy byla aplikace 1 μ l velikostního standardu do krajních jamek. Následně jsem k elektrodám elektroforetické vany připojila zdroj elektrického napětí, který jsem nastavila na 45 V, 500 mA a čas 30 minut.

Vložením gelu pod zdroj UV světla jsem zviditelnila proužky DNA nebo PCR fragmentů. V závislosti na intenzitě emise světla proužků jsem ověřila přítomnost a určila přibližnou koncentraci PCR fragmentů a DNA. Velikost PCR fragmentů jsem určovala pomocí porovnání s fragmenty velikostního standardu o známých velikostech, a to na základě jejich vzdálenosti od startu.

4.6 PCR

Přístroje:

Sterilní box PCR Cabinet (Esco ISOCIDETM, Rakousko)

Minitřepačka UV3 (VWR, USA)

Minicentrifuga Mini Star, 32 x 0,25ml mikrozskumavka (VWR, USA)

Cyklér C100TM (BIO-RAD, USA)

PCR směs primérů, reakční směsi a vody jsem připravovala pomocí sterilních špiček s filtrem ve sterilní PCR místnosti. Směs jsem následně krátce promíchala, centrifugovala a rozpipetovala do 0,25ml sterilních mikrozskumavek. Poté jsem ve sterilním boxu přidávala ke směsi vzorky. Směs se vzorky nebo vodou jsem krátce promíchala, centrifugovala a vložila do cykléru, kde jsem spustila příslušný program cyklování. PCR produkty jsem kontrolovala pomocí horizontální gelové elektroforézy (kapitola 4.5).

4.6.1 PCR amplifikace genu *KRAS* (exon 2)

Chemikálie:

GenoScan (Genomac, ČR)

- *KRAS* premix (reakční směs)
- *KRAS* primer mix (směs primérů) – neznámé sekvence, značené FAM
- PK-WT Control (pozitivní kontrola divokého typu - WT)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Tab. 4.2 shrnuje použité reagenty a jejich objemy, Tab. 4.3 nastavení programu cyklování – program HET54. Jako pozitivní kontrola byla použita kontrola WT, jako negativní kontrola PCR voda.

Tab. 4.2. PCR směs pro jeden vzorek.

Objem	Reagencie
5 µl	Reakční směs
2 µl	Směs primérů
3 µl	PCR voda
1 µl	vzorek
10 µl	Celkový objem

Tab. 4.3. Program HET54.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	4 min	34 x
2	94 °C	30 s	
3	54 °C	30 s	
4	72 °C	1 min	
5	72 °C	10 min	
6	4 °C	∞	

4.6.2 PCR amplifikace genů *GA733-2*, *CEA*, *EGFR* a *ACTB*

Chemikálie:

HotStarTaq Master Mix Kit (reakční směs) (Qiagen, Nizozemsko)

AdnaTest CancerColonDetect (AdnaGen, Německo)

- PrimerMix ColonDetect (směs primérů) – směs primérů pro amplifikaci genů *GA733-2* (*Gastrointestinal tumor-associated Antigen 2*), *CEA* (*CarcinoEmbryonic Antigen*), *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) a *ACTB* (*ACTin Beta*)
- Positive Control C+ (C+ pozitivní kontrola)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Tab. 4.4 shrnuje použité reagenty a jejich objemy, Tab. 4.5 nastavení programu cyklování – program CCD. Jako pozitivní kontrola byla použita C+ pozitivní kontrola, jako negativní kontrola PCR voda.

Tab. 4.4. PCR směs pro jeden vzorek.

Objem	Reagencie
12,5 µl	Reakční směs
2 µl	Směs primérů
6,5 µl	PCR voda
4 µl	vzorek
25 µl	Celkový objem

Tab. 4.5. Program CCD.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	15 min	38 x
2	94 °C	45 s	
3	58 °C	45 s	
4	72 °C	45 s	
5	72 °C	10 min	
6	4 °C	∞	

4.7 Reverzní transkripce

Přístroje:

Sterilní box DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)

Minicentrifuga Mini Star, 32 x 0,25ml mikrozkušavka (VWR, USA)

Minicentrifuga Mini Star, 8 x 2ml mikrozkušavka (VWR, USA)

Minitřepačka UV3 (VWR, USA)

Cyklér C100TM (BIO-RAD, USA)

Reverzní transkripci jsem prováděla ve sterilním boxu. Všechny používané reagenty a RNA jsem nejdříve rozmrazila, promíchala pipetou a krátce centrifugovala. Používala jsem výhradně sterilní špičky s filtrem. Reakční směsi a enzymy jsem po celou dobu práce měla umístěné v chladicím stojánku. Každá provedená RT zahrnovala také vzorek negativní kontroly RT (PCR voda místo RNA). Připravenou cDNA jsem poté skladovala při -20 °C.

4.7.1 Reverzní transkripce maturovaných miRNA a malých RNA soupravou qScript microRNA cDNASynthesis Kit

Chemikálie:

qScript™ microRNA cDNASynthesis Kit (Quanta Biosciences, USA)

- Poly(A) Tailing Buffer (5x) (pufr pro tvorbu polyA)
- Poly(A) Polymerase (polyA polymeráza)
- microRNA cDNA Reaction Mix (reakční směs)
- qScript Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

RT probíhala ve dvou reakčních krocích. V prvním kroku dochází k polyadenylaci RNA, ve druhém k vlastní reverzní transkripci. Nejprve jsem si připravila v 0,25ml mikrozkušavce reakční směs č. 1 sestávající z 2 μ l polyA pufru, 1 μ l polyA polymerázy a 2 μ l PCR vody (pro jeden vzorek). Následně jsem přidala 5 μ l RNA. Připravený roztok jsem po promíchání pipetou a krátké centrifugaci vložila do cykléru. Následně jsem spustila inkubační program QUANTA1 (Tab. 4.6). V průběhu inkubace jsem si připravila v 0,25ml mikrozkušavce reakční směs č. 2 složenou z 1 μ l reverzní transkriptázy a 9 μ l reakční směsi (pro jeden vzorek). Tu jsem promíchala pipetou a krátce centrifugovala. Po uplynutí inkubace jsem ke vzorku přidala 10 μ l reakční směsi č. 2, promíchala pipetou, krátce centrifugovala a vložila do cykléru, kde jsem spustila inkubační program QUANTA2 (Tab. 4.7) pro konečnou syntézu cDNA o celkovém objemu 20 μ l.

Tab. 4.6. Inkubační program QUANTA1.

Krok	Teplota	Čas
1	37 °C	20 min
2	70 °C	5 min
3	15 °C	∞

Tab. 4.7. Inkubační program QUANTA2.

Krok	Teplota	Čas
1	42 °C	20 min
2	85 °C	5 min
3	15 °C	∞

4.7.2 Reverzní transkripce v rámci optimalizačních kroků

- **Reverzní transkripce maturovaných miRNA a malých RNA soupravou QuantiMir RT Kit**

Chemikálie:

QuantiMir™ RT Kit (System Biosciences, USA)

- 5x PolyA Polymerase Buffer (polyA pufr)
- MnCl₂ (25 mM)
- ATP (5 mM)
- PolyA Polymerase (polyA polymeráza)
- Oligo dT Adaptor (adaptorová sekvence)
- 5x RT Buffer (RT pufr)
- dNTP mix (směs deoxynukleotidů)
- Dithiotreitol (0,1 M)
- Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

RT touto soupravou byla založená na stejném principu jako RT soupravou qScript microRNA cDNASynthesis Kit (kapitola 4.7.1). Lišila se 3 inkubačními kroky s rozdílnými teplotami a časy a složením reakčních směsí. Vstupní objem RNA byl 5 µl za vzniku 20,5 µl cDNA.

- **Reverzní transkripce maturovaných miRNA, pre-miRNA, ncRNA a mRNA soupravou miScript II RT Kit**

Chemikálie:

miScript II RT Kit (Qiagen, Nizozemsko)

- 5x miScript HiFlex Buffer (pufr HiFlex)
- 10x miScript Nucleic mix (směs nukleotidů)
- miScript Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

RT touto soupravou byla založená na stejném principu jako RT soupravou qScript microRNA cDNASynthesis Kit (kapitola 4.7.1). V tomto případě však šlo o jediný inkubační krok s odlišným nastavením teplot a času za použití jedné reakční směsi. Vstupní objem RNA byl 5 µl za vzniku 20 µl cDNA.

▪ **Reverzní transkripce maturovaných miRNA a malých RNA soupravou miScript II RT Kit**

Chemikálie:

miScript II RT Kit (Qiagen, Nizozemsko)

- 5x miScript HiSpec Buffer (pufr HiSpec)
- 10x miScript Nucleic mix (směs nukleotidů)
- miScript Reverse Transcriptase (reverzní transkriptáza)

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

RT touto soupravou byla založená na stejném principu jako RT soupravou qScript microRNA cDNASynthesis Kit (kapitola 4.7.1). V tomto případě však šlo o jediný inkubační krok s odlišným nastavením teplot a času za použití jedné reakční směsi. Vstupní objem RNA byl 5 µl za vzniku 20 µl cDNA.

4.8 qPCR

Přístroje:

Minicentrifuga Mini Star, 32 x 0,25ml mikrozkušavka (VWR, USA)

Minicentrifuga Mini Star, 8 x 2ml mikrozkušavka (VWR, USA)

Minitřepačka UV3 (VWR, USA)

Sterilní box PCR Cabinet (Esco ISOCIDETM, Rakousko)

Cyklér Agilent Technologies Mx3000P pro PCR v reálném čase (Stratagene, USA)

Počítačové programy:

MxPro Mx300P, verze 4.10 (Stratagene, USA)

PCR směs primérů, reakční směsi a vody jsem připravovala pomocí sterilních špiček s filtrem ve sterilní PCR místnosti. Vždy jsem použila pravý univerzální primér a levý primér pro kvantifikaci dané miRNA nebo RNU6b. Směs jsem následně krátce promíchala, centrifugovala a rozpipetovala do bloků po 8 sterilních 0,25ml mikrozkušavkách. Poté jsem

ve sterilním boxu přidávala ke směsi vzorky. Směs se vzorky jsem krátce promíchala, centrifugovala a vložila do cykléru na přesně definované pozice. Spustila jsem program cyklování s následnou analýzou disociační křivky pro ověření kvality produktů. Výsledky jsem vyhodnocovala pomocí počítačového programu MxPro Mx300P.

4.8.1 qPCR soupravou PerfeCTa microRNA Assay

Chemikálie:

PerfeCTa microRNA Assay (Quanta Biosciences, USA)

- PerfeCTa SYBR Green SuperMix, Low ROX (reakční směs)
- PerfeCTa Universal PCR Primer (pravý univerzální primér o neznámé sekvenci)

MIR21_5p_1 (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér miR-21)

5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'

MIR10b-5p_1 (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér miR-10b)

5'-TACCCTGTAGAACCGAATTTGT-3'

RNU6b-novy_pro_UP (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér RNU6b)

5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTT-3'

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

Tab. 4.8 shrnuje použité reagenty a jejich objemy. Součástí každé qPCR pro danou miRNA nebo RNU6b byla také negativní kontrola RT (viz kapitola 4.7) a negativní PCR kontrola (PCR voda). Nastavení programu cyklování, záznam fluorescence a nastavení analýzy disociační křivky shrnuje Tab. 4.9.

Tab. 4.8. PCR směs pro jeden vzorek.

Objem	Reagencie
5 µl	reakční směs
1 µl	pravý univerzální primér (2 µM)
1 µl	levý primér miR-21, miR-10b nebo RNU6b (2 µM)
2 µl	PCR voda
1 µl	vzorek
10 µl	Celkový objem

Tab. 4.9. Program pro kvantitativní analýzu miRNA (krok 1-4) s následnou analýzou disociační křivky (krok 5-7).

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů	Záznam fluorescence
1	95 °C	15 min	40x	na konci každého cyklu
2	94 °C	15s		
3	60 °C	30s		
4	70 °C	30s		
5	95 °C	1 min	v celém průběhu zvyšování teploty	
6	55 °C	30s		
7	95 °C	30s		

4.8.2 qPCR v rámci optimalizačních kroků

▪ Původní protokol qPCR soupravou PerfeCTa microRNA Assay

Metodický postup byl shodný s výše popsáním optimalizovaným postupem (viz 4.8.1 qPCR soupravou PerfeCTa microRNA Assay). Rozdíl byl pouze v nastavení teplotního PCR programu, kdy bylo působení jednotlivých teplot výrazně kratší (Tab. 4.10).

Tab. 4.10. Program pro kvantitativní analýzu miRNA.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů	Záznam fluorescence
1	95 °C	2 min	40x	na konci každého cyklu
2	94 °C	5s		
3	60 °C	15s		
4	70 °C	15s		

▪ Původní protokol qPCR soupravou miScript SYBR Green PCR Kit

Chemikálie:

miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Nizozemsko)

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (reakční směs)
- miScript Universal Primer (pravý univerzální primér) - neznámá sekvence

MIR21_5p_1 (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér miR-21)

5'-TAGCTTATCAGACTGATGTTGA-3'

MIR10b-5p_1 (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér miR-10b)

5'-TACCCTGTAGAACCGAATTTGT-3'

RNU6b-novy_pro_UP (Sigma-Aldrich, USA) (levý primér RNU6b)

5'-ACGCAAATTCGTGAAGCGTT-3'

PCR Ultra H₂O (PCR voda) (Top-Bio, ČR)

qPCR touto soupravou byla metodicky velmi podobná qPCR soupravou PerfeCTa microRNA Assay (kapitola 4.8.1). Hlavním rozdílem byla koncentrace (10 mM) a teplota nasedání primérů 55 °C (krok 3 v Tab. 4.9). Objemové složení PCR směsi bylo shodné (viz Tab. 4.8).

4.9 Heteroduplexní analýza genu *KRAS* pomocí DCE

Přístroje:

Cyklér C100TM (BIO-RAD, USA)

16-kapilárový DNA analyzátor ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

Centrifuga Universal 32 s nástavci a regulací času, teploty a otáček, 2 x 96-jamková destička (Hettich, Německo)

Chemikálie:

Demineralizovaná voda (Genomac, ČR)

GenoScan (Genomac, ČR)

- Kontrolní PCR produkty značené TAMRA (Tab. 4.11)

Tab. 4.11. Přehled kontrolních PCR produktů genu *KRAS*.

Kontrolní PCR produkt	Typ mutace na proteinové úrovni
PCR_Gly12Val_TAM	Gly12Val (GGT>GTT)
PCR_Gly13Asp_TAM	Gly13Asp (GGC>GAC)
PCR_Gly12Asp_TAM	Gly12Asp (GGT>GAT)
PCR_Gly12Arg_TAM	Gly12Arg (GGT>CGT)
PCR_Gly12Cys_TAM	Gly12Cys (GGT>TGT)
PCR_Gly12Ala_TAM	Gly12Ala (GGT>GCT)
PCR_Gly13Cys_TAM	Gly13Cys (GGC>TGC)
PCR_Gly12Ser_TAM	Gly12Ser (GGT>AGT)

CE Running Pufr pro DNA analyzátoři ABI 3100/3130 (Carolina Biosystems, ČR)

POP-7TM polymer (Applied Biosystems, USA)

Počítačové programy:

Gene Marker, verze 2.4.2 (SoftGenetics, USA)

PCR produkty genu *KRAS* (viz 4.6.1 PCR amplifikace genu) jsem vložila do cykléru a spustila program pro tvorbu heteroduplexů (program HT8MIN) (Tab. 4.12). Následně jsem produkty připravila pro DCE analýzu.

Tab. 4.12. Program HT8MIN.

Krok	Teplota	Čas	Poznámky
1	95 °C	8 min	
2	65 °C	30 min	
3	15 °C	∞	pokles teploty o 0,10 °C za sekundu

Vzorky, pozitivní PCR kontroly a negativní PCR kontroly jsem 100x ředila do 96-jamkové destičky, a to ve dvou paralelách. První paralela vzorku byla bez kontrolního PCR produktu, kdy jsem k 99 µl demineralizované vody přidala 1 µl vzorku. Druhá paralela byla směsí vzorku s kontrolním PCR produktem, kdy jsem k 99 µl PCR_Gly12Val_TAM přidala 1 µl vzorku. Směs jsem vždy pečlivě promíchala pipetou. Následně jsem celou destičku krátce centrifugovala a poté vložila do DNA analyzátoru ABI PRISM 3100.

Na analyzátoru jsem nastavila podmínky detekce (Tab. 4.13), definovala pozici vzorků a zkontrolovala dostatek POP-7 polymeru a CE Running pufru. Výsledky jsem vyhodnotila pomocí počítačového programu Gene Marker. Pro nalezení typu případné mutace jsem tyto vzorky později analyzovala s vytipovanými kontrolními PCR produkty značenými TAMRA (Tab. 4.11).

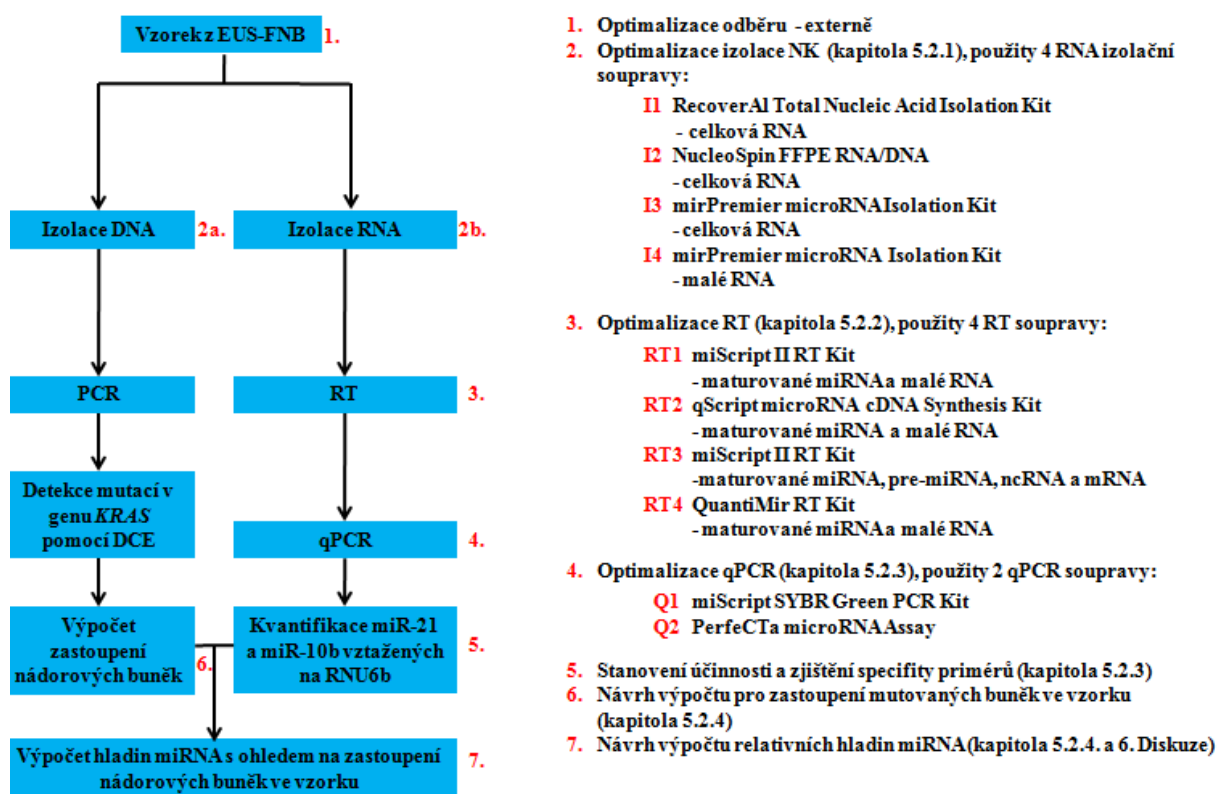
Tab. 4.13. Nastavení a parametry DNA analyzátoru.

Parametry přístroje	
Kapilára	36cm
Polymer	POP-7 polymer
Dye set	G5
Pufr	CE Running Pufr
Nastavení analýzy	
Data delay	1
Voltage step interval	1
No. of steps	10
Injection voltage	3 kV
Injection time	6 s
Run voltage	15 kV
Run time	1300 s
Temperature	50 °C

5 Výsledky

5.1 Organizace postupů

Obr. 5.1 shrnuje organizaci a optimalizaci laboratorních postupů a seznam zkratk komerčních souprav. Tyto zkratky jsou pro zjednodušení a lepší orientaci používány v celé výsledkové a diskusní části této práce.



Obr. 5.1. Schéma organizace a optimalizace postupů pro kvantifikaci expresí miRNA a přehled komerčních souprav použitých v rámci optimalizace.

5.2 Vývoj postupů

Tab. 5.1. Přehled použitých vzorků použitých pro optimalizaci laboratorních postupů.

Izolace NK	SL1, SL2, SL3, SL4
Reverzní transkripce	SL1, SL2
qRT-PCR	SL14, SL16, SL18, SL19, SL20, SL21, SL65, SL66, SL67, SL68, SL69, SL70

5.2.1 Optimalizace izolace NK

Za účelem dosažení co nejvyšších výtěžků RNA jsem v rámci optimalizací porovnávala 4 druhy komerčních souprav (I1-I4). Dále jsem sledovala, zda má druh použité RNA izolační soupravy vliv na kvalitu a množství DNA. Vhodnost použití komerční soupravy pro izolaci RNA a DNA jsem posuzovala na základě vstupních a výstupních parametrů.

▪ Vstupní parametry pro výběr izolační soupravy

Vstupním parametrem pro výběr vhodné RNA izolační soupravy byla její cena, nutnost speciálního materiálního vybavení a časová náročnost izolace RNA (Tab. 5.2).

Tab. 5.2. Vstupní parametry výběru izolační soupravy. Zeleně jsou zvýrazněny nejlepší, červeně nejhorší hodnoty.

Izolační souprava	Cena pro jeden vzorek	Nutnost speciálního vybavení	Časová náročnost	
			Časová náročnost pro 5 vzorků	Časová náročnost pro 10 vzorků
I1	276 Kč	Ne	75 min	90 min
I2	229 Kč	Ne	85 min	100 min
I3	196 Kč	sterilní homogenizátor a digestoř pro práci s 2-merkaptoethanolem	95 min	145 min
I4	196 Kč	sterilní homogenizátor a digestoř pro práci s 2-merkaptoethanolem	100 min	155 min

Závěr zhodnocení vstupních parametrů: Izolační souprava I1 je dražší v porovnání se soupravami I2, I3 a I4, avšak v hodnotách ostatních parametrů jasně převažuje.

▪ Výstupní parametry pro výběr izolační soupravy

Výstupní parametry pro výběr izolační soupravy zahrnovaly koncentraci NK a celkový výtěžek izolované RNA (Tab. 5.3). Kvalitu izolovaných NK jsem vyhodnocovala na základě výtěžku amplifikace standardních genů (Obr. 5.2 a Obr. 5.3).

Tab. 5.3. Koncentrace NK.

Data byla získána pomocí fluorometrie přístrojem Qubit 2.0 Fluorometer s použitím souprav Qubit RNA HS Assay kit a Qubit DNA HS Assay kit (Life Technologies, USA) (naměřeno Mgr. Terezou Hálkovou, Genomac International s.r.o.). Zeleně jsou znázorněny nejvyšší koncentrace NK v rámci jednoho vzorku, červeně nejnižší, srovnatelné koncentrace nejsou zvýrazněny (x - neizolované vzorky).

Vzorek → Izolační souprava ↓	SL1 Koncentrace [ng·μl ⁻¹]		SL2 Koncentrace [ng·μl ⁻¹]		SL3 Koncentrace [ng·μl ⁻¹]		SL4 Koncentrace [ng·μl ⁻¹]	
	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
I1	2,61	6,00	15,80	6,49	0,58	< 0,05	5,16	< 0,05
I2	1,85	< 0,05	7,14	< 0,05	x	x	x	x
I3	x	x	x	x	0,59	< 0,05	< 0,05	< 0,05
I4	x	x	x	x	1,10	< 0,05	4,75	< 0,05

Koncentrace DNA byla nejvyšší při použití soupravy I1. Protože jsem eluovala DNA do stejného objemu 40 μl u všech RNA souprav, je výsledný celkový výtěžek v ng rovný čtyřicetinásobku naměřené koncentrace.

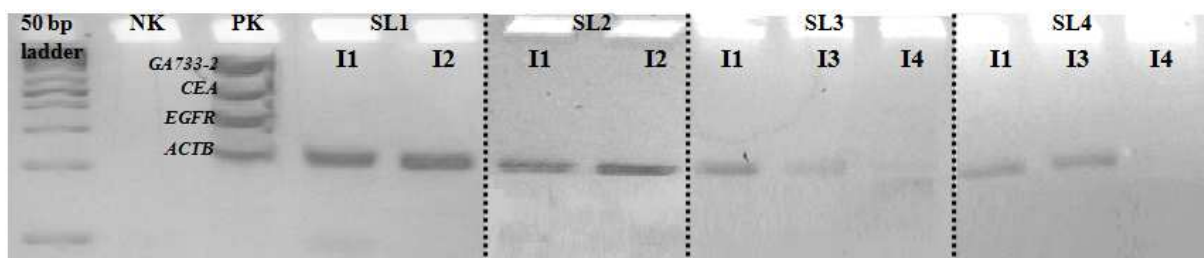
Koncentrace RNA byla měřitelná pouze u vzorků SL1 a SL2 izolovaných soupravou I1. Z tohoto důvodu jsem nebyla schopna porovnávat její celkové výtěžky v rámci použitých souprav. Izolační soupravy se liší v elučních objemech, a tak je při takto nízkých koncentracích žádoucí získat, co nejvyšší objem RNA (Tab. 5.4). Tyto požadavky splňují izolační soupravy I4 a I1.

Tab. 5.4. Eluční objemy u použitých izolačních souprav.

Zeleně jsou znázorněny nejvyšší eluční objemy RNA v rámci jednoho vzorku, zeleně nejnižší.

Izolační souprava	Eluční objem
I1	60 μl
I2	20 μl
I3	25 μl
I4	75 μl

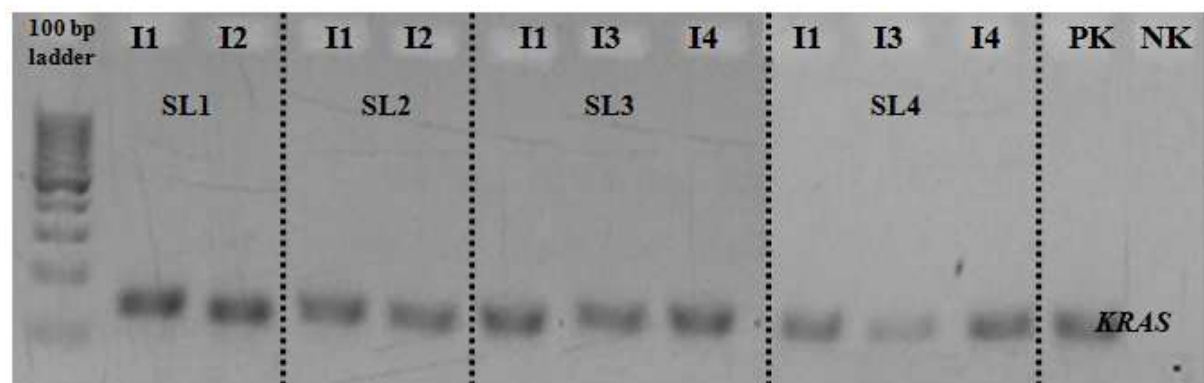
Kvalitu RNA jsem vyhodnocovala na základě amplifikace genů *GA733-2*, *CEA*, *EGFR* a *ACTB* (Obr. 5.2), kvalitu DNA na základě amplifikace genu *KRAS* (Obr. 5.3) s následným hodnocením polohy proužků a nepřítomnosti vedlejších produktů amplifikace na agarózovém gelu. Nepřímo jsem také hodnotila výtěžky NK, a to na základě intenzity proužků.



Obr. 5.2. Výtěžky a kvalita RNA.

RT souprava: RT1. 4% agarózový gel, 5 μ l vzorku + 3 μ l vkládacího pufru. PK – pozitivní PCR kontrola C+, NK – negativní PCR kontrola, ladder – velikostní standard.

Amplifikován byl pouze gen *ACTB* (111 bp), a to díky použití soupravy pro reverzní transkripci, která transkribuje pouze malé RNA. Kvalita a výtěžek RNA je při použití izolačních souprav I1 a I2 srovnatelný. Po srovnání kvality a výtěžku RNA použitím soupravy I1 se soupravami I3 a I4 se tato jeví jako nejvhodnější.



Obr. 5.3. Výtěžky a kvalita DNA.

2% agarózový gel, 1 μ l vzorků. PK – pozitivní PCR kontrola WT, NK – negativní PCR kontrola, ladder – velikostní standard.

Kvalita DNA je u všech produktů amplifikace *KRAS* srovnatelná s výjimkou použití izolační soupravy I3 u vzorku SL4, kde je výtěžek *KRAS* nižší (Obr. 5.3).

Závěr zhodnocení výstupních parametrů: Na základě zhodnocení výstupních parametrů je nejvhodnější použití izolační soupravy I1. Použitím této soupravy jsem získala nejvyšší výtěžky NK a nepřímo amplifikací stanovila jedny z nejvyšších koncentrací RNA o vysoké kvalitě. I když u některých vzorků nebyla detekována RNA, je soupravou I1 získán poměrně vysoký objem, který lze pro další účely snížit, a tím i koncentrovat izolované RNA. V neposlední řadě jsem použitím této soupravy získala dostatek kvalitní DNA pro další analýzy.

▪ Výsledek optimalizace izolace NK

Na základě zhodnocení vstupních a výstupních parametrů jsem vybrala izolační soupravu I1, která je pro naše účely nejvhodnější.

5.2.2 Optimalizace RT

Za účelem dosažení co nejvyšších výtěžků cDNA jsem v rámci optimalizací porovnávala 4 druhy komerčních souprav (RT1-RT4). Vhodnost použití komerční soupravy pro RT jsem posuzovala na základě vstupních a výstupních parametrů.

▪ Vstupní parametry pro výběr RT soupravy

Vstupním parametrem pro výběr RT soupravy byla především cena RT a také následné qPCR (je nutné použití originálního univerzálního priméru, který je často součástí qPCR soupravy), časová náročnost a počet kroků, tzn. inkubace a manipulace se vzorkem (Tab. 5.1

Tab. 5.1).

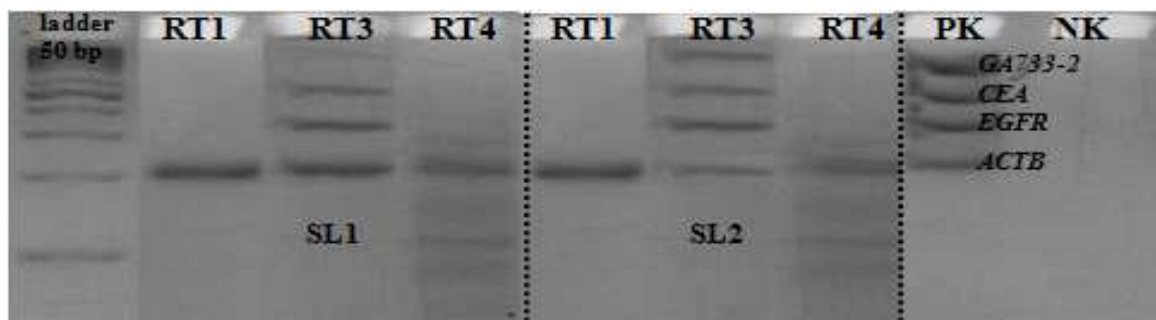
Tab. 5.1. Vstupní parametry výběr RT soupravy. Zeleně jsou znázorněny nejlepší, červeně nejhorší hodnoty.

RT souprava	Celková cena jedné RT + qPCR reakce	Časová náročnost pro 5 vzorků	Časová náročnost pro 10 vzorků	Počet kroků
RT1	247 Kč	80 min	85 min	1
RT2	166 Kč	60 min	70 min	2
RT3	247 Kč	80 min	85 min	1
RT4	729 Kč	130 min	150 min	3

Závěr zhodnocení vstupních parametrů: Dle vstupních parametrů se jako nejlepší jeví RT souprava RT2, a to především díky její nízké ceně a malé časové náročnosti.

▪ Výstupní parametry pro výběr RT soupravy

Výstupním parametrem pro výběr RT soupravy byla kvalita a výtěžek cDNA. cDNA jsem amplifikovala v oblastech genů *GA733-2*, *CEA*, *EGFR* a *ACTB* a detekovala v agarózovém gelu, kde jsem hodnotila výtěžky (intenzita proužků) a kvalitu amplifikátů (poloha proužků a nepřítomnost vedlejších produktů amplifikace) (Obr. 5.4).



Obr. 5.4. Kvalita a výtěžky cDNA.

4% agarózový gel, 5 µl vzorku + 3 µl vkladacího pufru. PK – pozitivní PCR kontrola C+, NK – negativní PCR kontrola, ladder – velikostní standard.

Protože jsou soupravou RT1 a RT4 transkribovány pouze malé RNA, amplifikoval se pouze gen *ACTB* (111 bp). To neplatí pro soupravu RT3, kde se amplifikovaly všechny 4 geny. Největší kvalita cDNA je po použití RT soupravy RT1 a RT3, kde se neobjevily žádné vedlejší produkty. Největší výtěžek *ACTB* byl při použití soupravy RT1.

Závěr zhodnocení výstupních parametrů: Na základě výstupních parametrů se jeví nejlépe použití RT soupravy RT1. Souprava RT2 nebyla hodnocena.

▪ Výsledek optimalizace RT

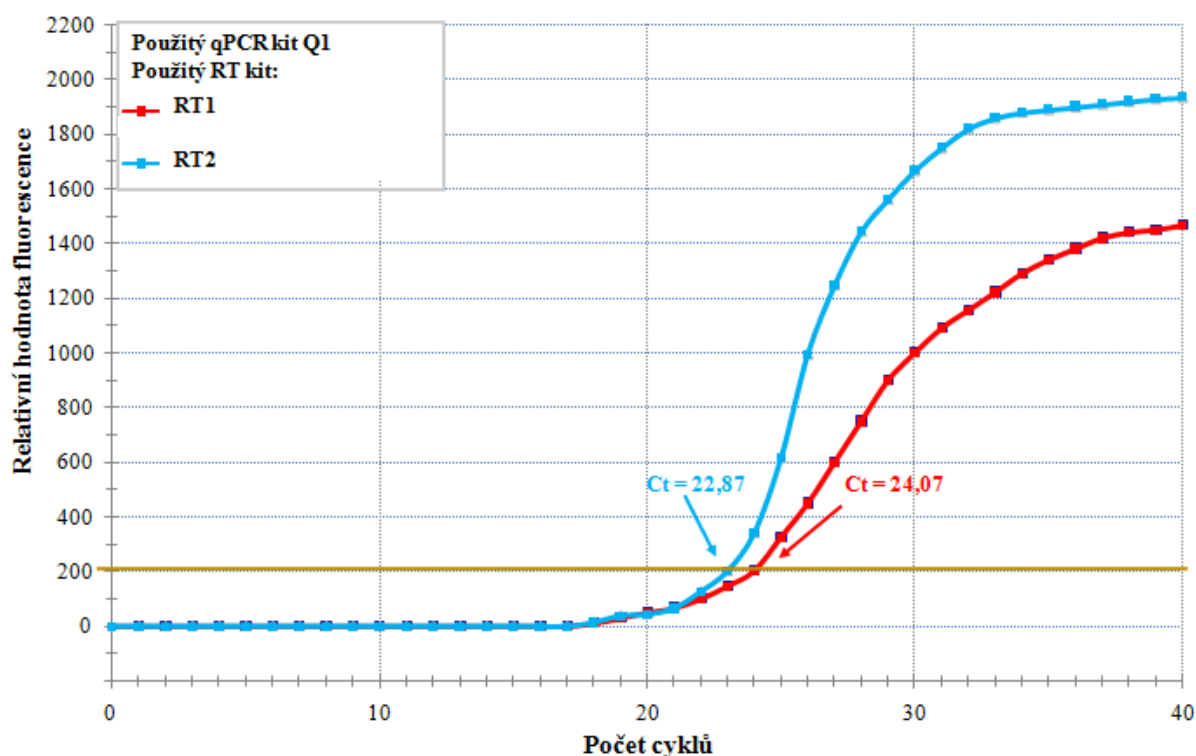
Na základě vstupních a výstupních parametrů jsem vybrala RT soupravy RT1 a RT2. Získanou cDNA jsem dále porovnávala pomocí qPCR a hodnotila qRT-PCR jako celek (viz dále).

5.2.3 Optimalizace qPCR

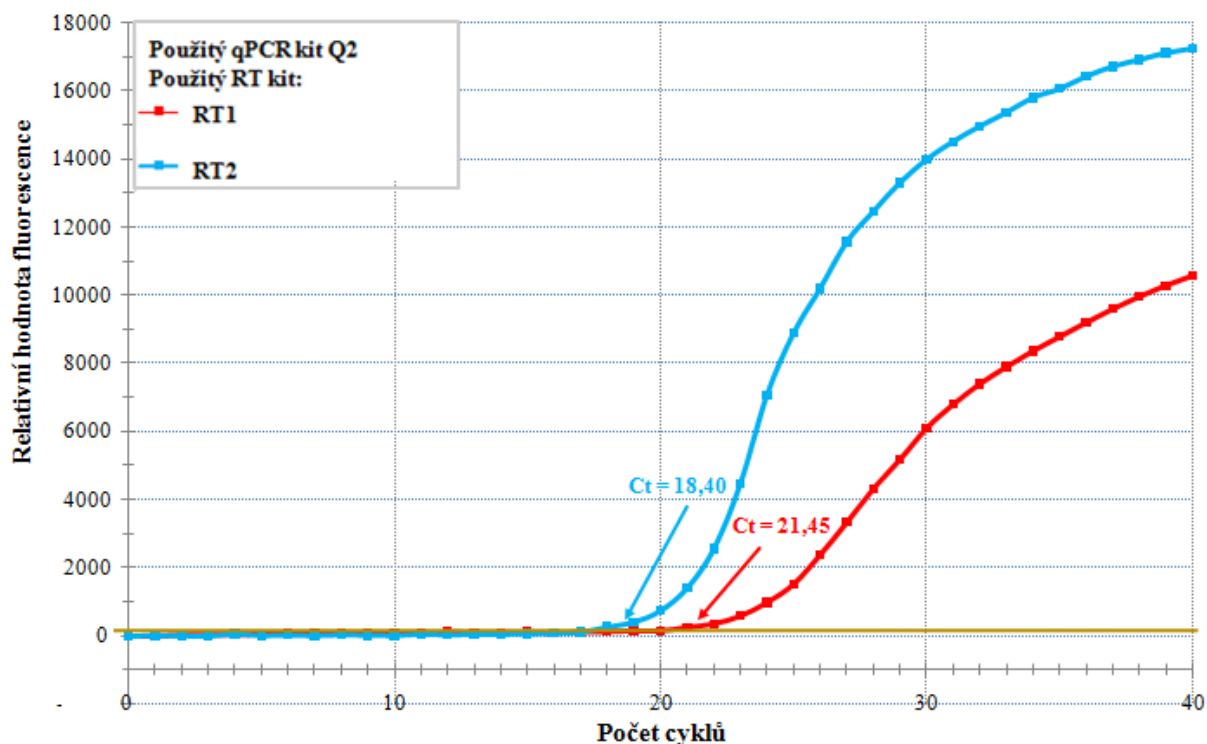
▪ Výběr kombinace RT a qPCR soupravy

Vzhledem k malému množství získaných RNA bylo velmi důležité optimalizovat postup RT a qPCR tak, abychom byly schopni v laboratoři detekovat i minimální množství miRNA. V první fázi optimalizace qPCR jsem proto zjišťovala, pomocí které kombinace RT a qPCR soupravy je dosaženo lepšího výsledku amplifikací. Sledovala jsem především, ve kterém cyklu dochází k dřívějšímu dosažení hodnoty Ct a průběh amplifikační křivky.

Nejdříve jsem hodnotila výsledky amplifikace s nastavením teplotního programu dle původních protokolů (kapitola 4.8.2 metodické části) u několika vzorků a miRNA. K tomu jsem použila soupravy Q1 nebo Q2 v kombinaci s vybranými RT soupravami RT1 a RT2 (univerzální priméry jsem zachovala vzhledem k RT soupravě). Příklady výsledků jsou uvedeny na Obr. 5.5 a Obr. 5.6.



Obr. 5.5. qPCR analýza při použití RT soupravy RT1 a RT2 v kombinaci s qPCR soupravou Q1. Vzorek SL20, amplifikace miR-21. U každé amplifikační křivky jsou uvedeny hodnoty Ct, kdy bylo u daného vzorku dosaženo fluorescence rovnající se 200 (r.u.).

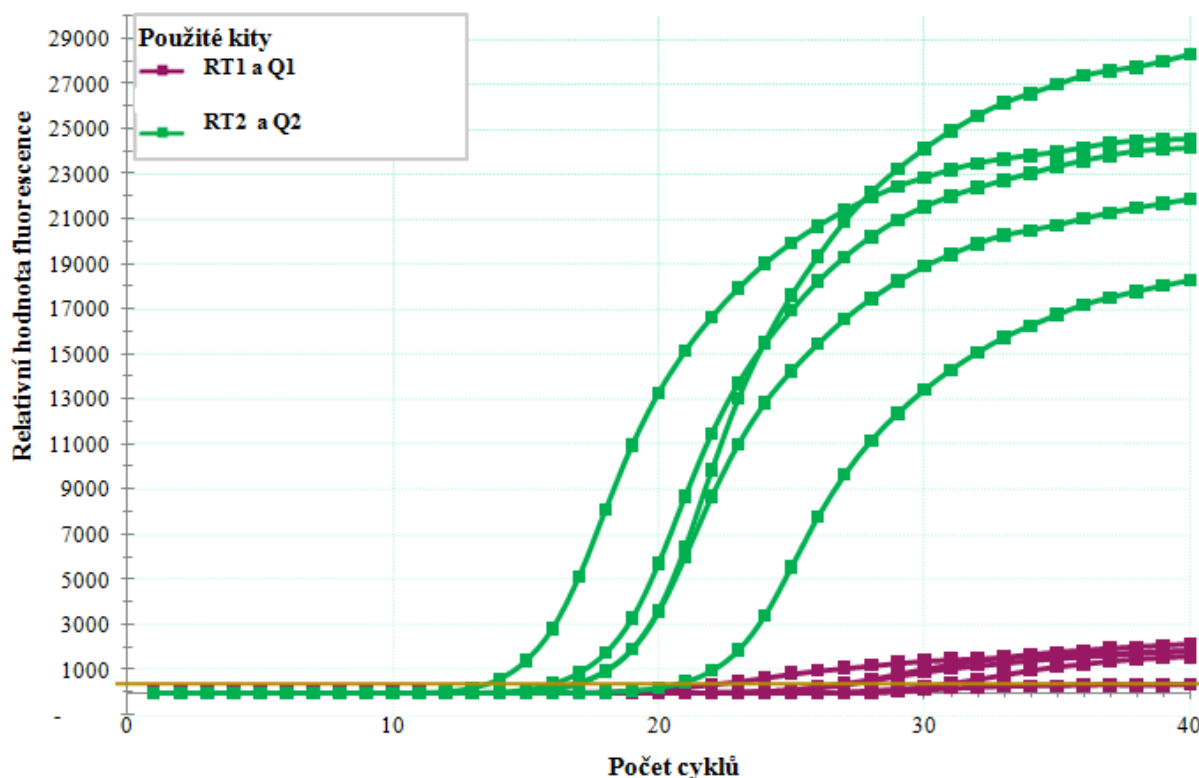


Obr. 5.6. qPCR analýza při použití RT soupravy RT1 a RT2 v kombinaci s qPCR soupravou Q2. Vzorek SL20, amplifikace miR-21.

U každé amplifikační křivky jsou uvedeny hodnoty Ct, kdy bylo u daného vzorku dosaženo fluorescence rovnající se 200 (r.u.).

Na základě porovnání hodnot Ct z Obr. 5.5 a Obr. 5.6 jsem zjistila, že reverzní transkripce soupravou RT2 je pravděpodobně účinnější než soupravou RT1. Samotná qPCR je lepší při použití reakční směsi z qPCR soupravy Q2 než soupravy Q1. Jako vhodná kombinace RT a qPCR souprav se proto jeví kombinace RT2 a Q2, jejichž použitím byla získána nejnižší hodnota Ct a amplifikační křivka s výborným průběhem.

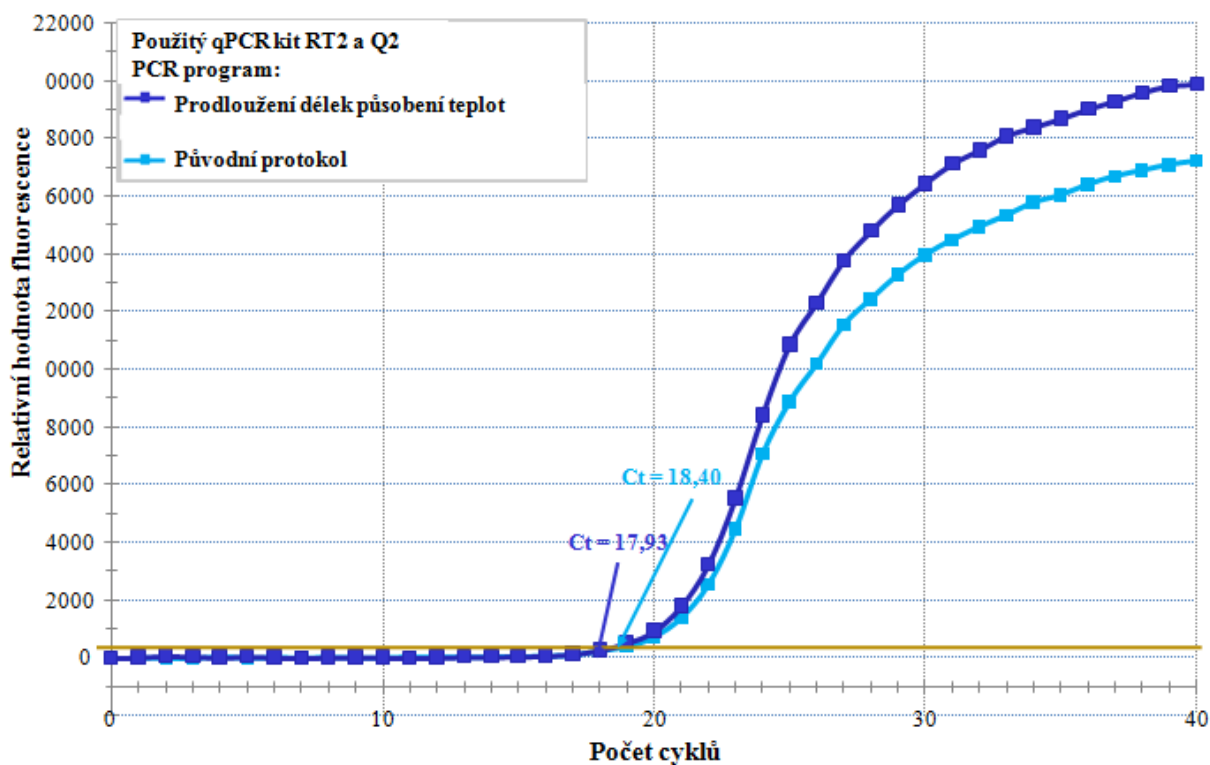
Abych vyloučila, že jsou tyto výsledky ovlivněny podmínkami PCR programu, zvolila jsem pro obě qPCR soupravy stejné podmínky PCR programu. Nastavení PCR programu se u soupravy Q1 liší nižší teplotou pro nasedání primérů (55 °C oproti 60 °C u soupravy Q2) a délkou působení jednotlivých teplot. Proto jsem zvolila stejnou hodnotu teploty pro nasedání primérů, a to 57 °C, a prodloužila počáteční denaturaci a jednotlivé časy cyklování podle původního protokolu pro soupravu Q1. Pro toto srovnání jsem použila doporučené RT soupravy, tedy kombinaci RT1 a Q1 a kombinaci RT2 a Q2 (Obr. 5.7).



Obr. 5.7. Srovnání kombinací RT a qPCR souprav se shodným nastavením PCR programů. Použité vzorky: SL14, SL16, SL17, SL19, SL21, amplifikace RNU6b.

Z výsledků této analýzy vyplývá, že ačkoli byly pro obě kombinace souprav zajištěny stejné podmínky analýz, kombinace soupravy RT2 a Q2 je jednoznačně pro amplifikaci účinnější. Hodnoty Ct se u této kombinace souprav nacházely v rozmezí od 13 do 21 cyklů, oproti kombinaci RT1 a Q1, jejichž hodnoty Ct byly v rozmezí od 22 do 30 cyklů, což je přibližně v průměru o 9 cyklů později.

Na základě výsledků prezentovaných výše jsem se rozhodla, že budu dále pracovat s kombinací souprav RT2 a Q2. Protože mohou být hodnoty Ct ovlivněny délkou působení teplot, prodloužila jsem počáteční denaturaci a jednotlivé časy cyklování a zachovala teplotu pro nasedání primérů (postup viz kapitola 4.8.1 v metodické části). Srovnání PCR programů podle původního protokolu a s prodlouženými časy působení jednotlivých teplot je ukázán na vybraném vzorku a miRNA na Obr. 5.8.



Obr. 5.8. Srovnání qPCR analýz při modifikaci délek působení teplot PCR programu.

Vzorek: SL20, amplifikace miR-21.

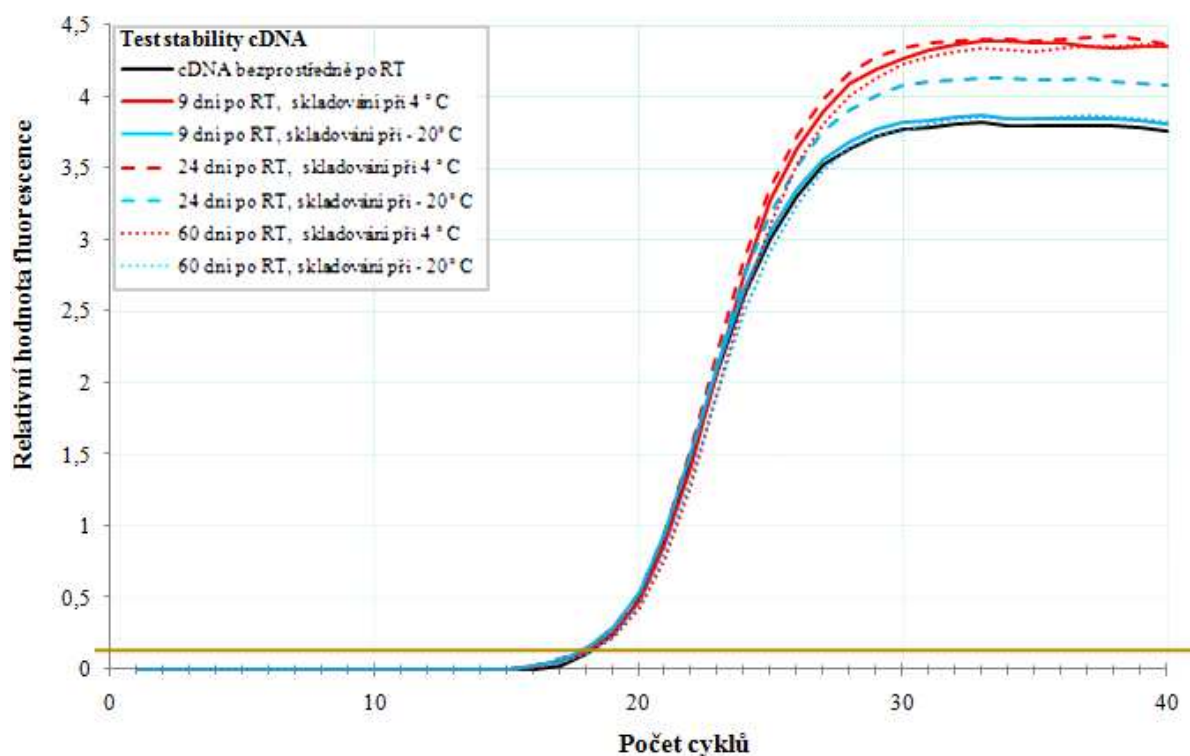
U každé amplifikační křivky jsou uvedeny hodnoty Ct, kdy bylo u daného vzorku dosaženo fluorescence rovnající se 200 (r.u.).

Prodloužením délky působení jednotlivých teplot PCR programu došlo také ke snížení hodnoty Ct, a to zhruba o půl cyklu. V případě méně koncentrovaného vzorku je i takto malý rozdíl hodnoty Ct žádoucí.

Závěr výběru qPCR souprav: Dle qPCR analýz jsem pro naše účely vybrala kombinaci souprav RT2 a Q2 s prodloužením časů působení teplot PCR programu.

▪ Testy stability cDNA

Na několika vzorcích jsem provedla test stability cDNA, která byla skladována při 4 °C nebo -20 °C po dobu několika týdnů. Pokus shrnuje Obr. 5.9.

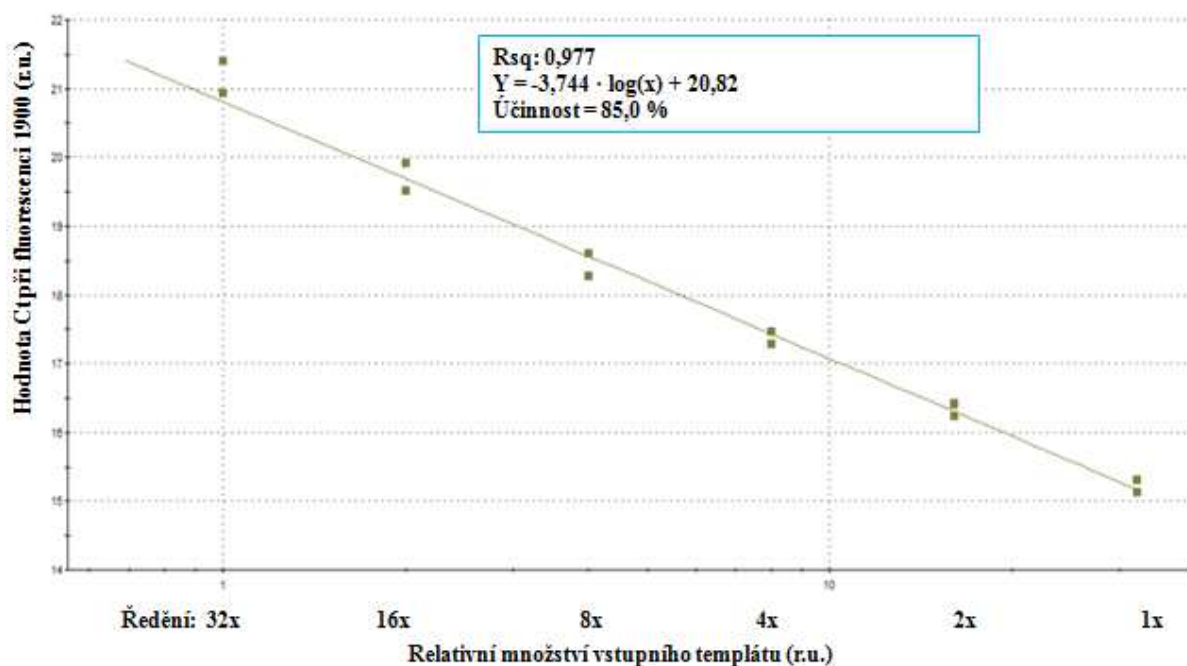


Obr. 5.9. Test stability cDNA při dlouhodobém skladování v chladícím nebo mrazícím zařízení. Vzorek: SL16, amplifikace RNU6b.

Závěr testování: Stabilita cDNA nebyla ovlivněna způsobem, délkou skladování a opakovaným rozmrazováním ani u jednoho z testovaných vzorků a miRNA. Hodnoty Ct se navzájem lišily pouze o desetiny cyklů. Pro budoucí účely to znamená, že pomocí qPCR získáme srovnatelné výsledky při použití ctDNA čerstvé i skladované až 2 měsíce, ať už při 4 °C nebo -20 °C.

▪ Stanovení účinnosti primérů

Provedla jsem několik analýz standardní křivky, a to na 4 vzorcích, kdy jsem každý ředila 1x, 2x, 4x, 8x, 16x a 32x. Pro případné odhalení chyby v pipetování jsem každý vzorek ředila ve dvou paralelách. Výsledkem bylo tedy celkem 8 naměřených účinností pro každou miRNA nebo RNU6b. Příklad jedné z analýz standardní křivky je na Obr. 5.10, průměrné hodnoty naměřených účinností jsou uvedeny v Tab. 5.5.



Obr. 5.10. Příklad analýzy standardní křivky.

Vzorek: SL66, amplifikace miR-21. Účinnost měřena ve dvou paralelních ředěních vzorku.

Tab. 5.5. Průměrná účinnost primérů pro miR-21, miR-10b a RNU6b.

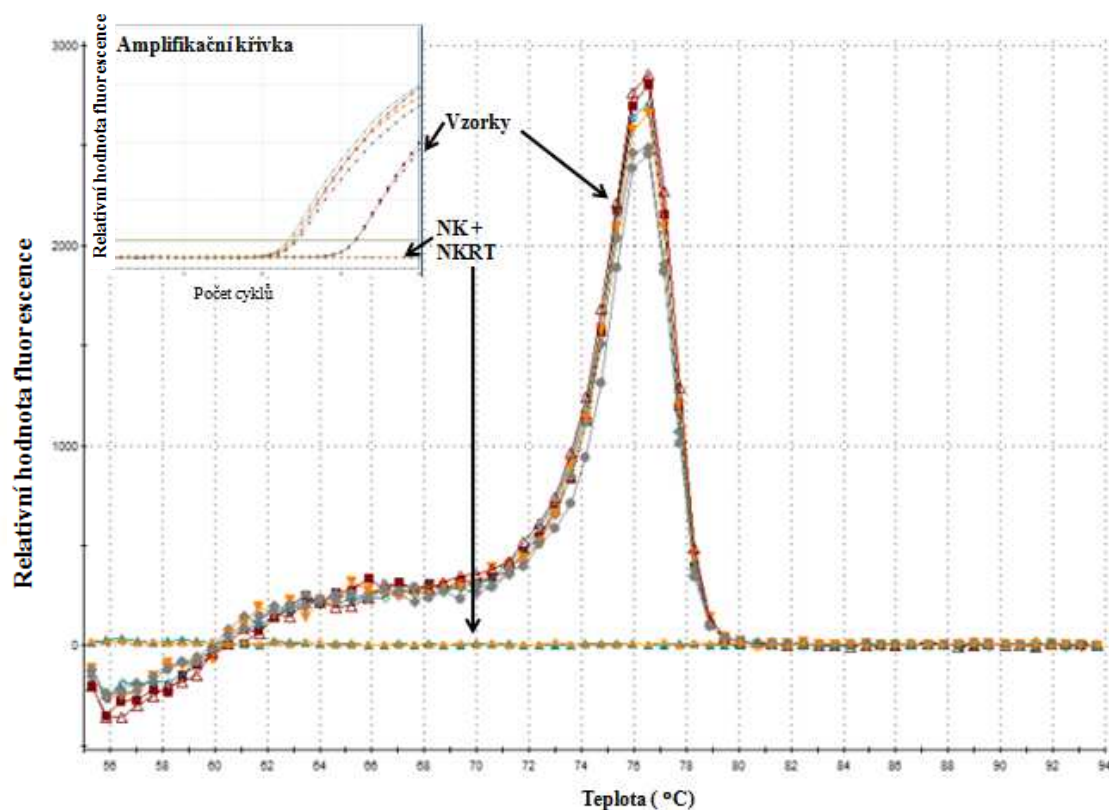
Počet měření: 8. Použité vzorky: SL66 – SL69. Hladina významnosti < 0,05. Výsledek ve formátu: průměr účinnosti ± interval spolehlivosti (sr - relativní směrodatná odchylka).

RNA	Průměrná účinnost
miR-10b	94,88 ± 2,82 % (sr = 3,02 %)
miR-21	83,85 ± 3,74 % (sr = 4,55 %)
RNU6b	76,68 ± 1,25 % (sr = 1,69 %)

Závěr stanovení účinnosti primérů: U vybraných vzorků byla pomocí ředící řady stanovena účinnost primérů, která byla u obou miRNA a RNU6b vyšší než 76 %.

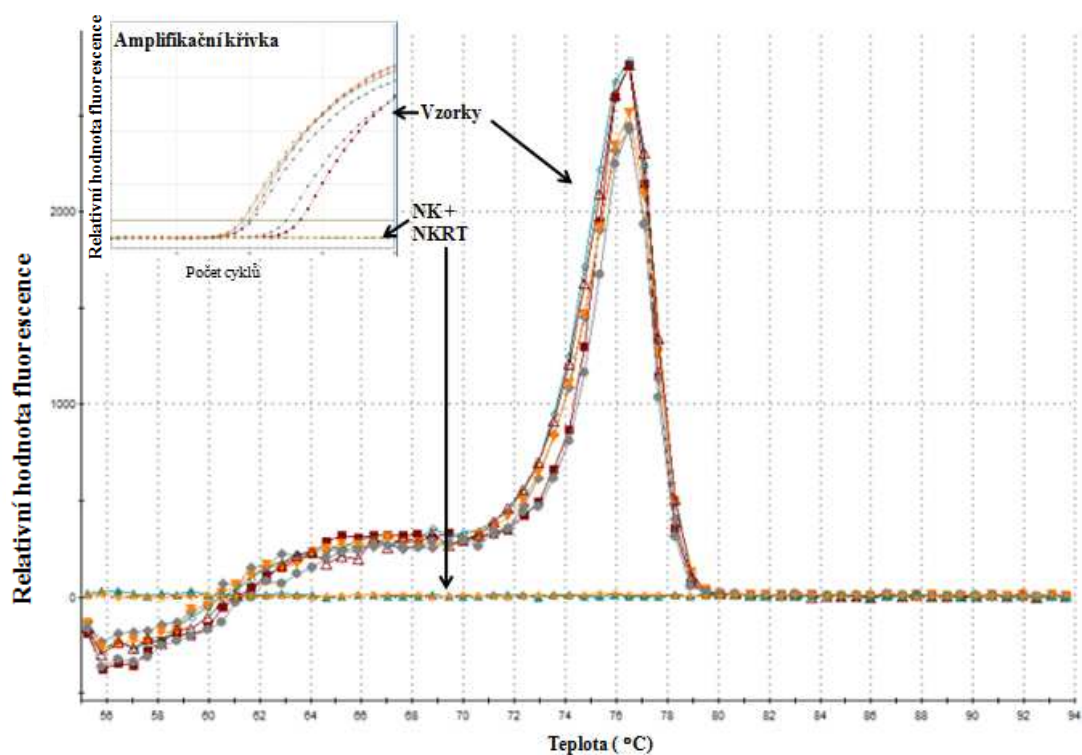
▪ Zjištění specifity primérů

Z důvodů zjištění specifity naměřených hodnot Ct jsem k optimalizovanému PCR programu přidala program pro analýzu disociační křivky (viz kapitola 4.8.1 v metodické části). U miR-10b, miR-21 a RNU6b jsem vždy sledovala, zda se amplifikuje správný produkt a zda se neamplifikuje produkt v negativních PCR kontrolách a negativních kontrolách RT. Příklady běžných amplifikačních a disociačních křivek jsou uvedeny na Obr. 5.11, Obr. 5.12 a Obr. 5.13.



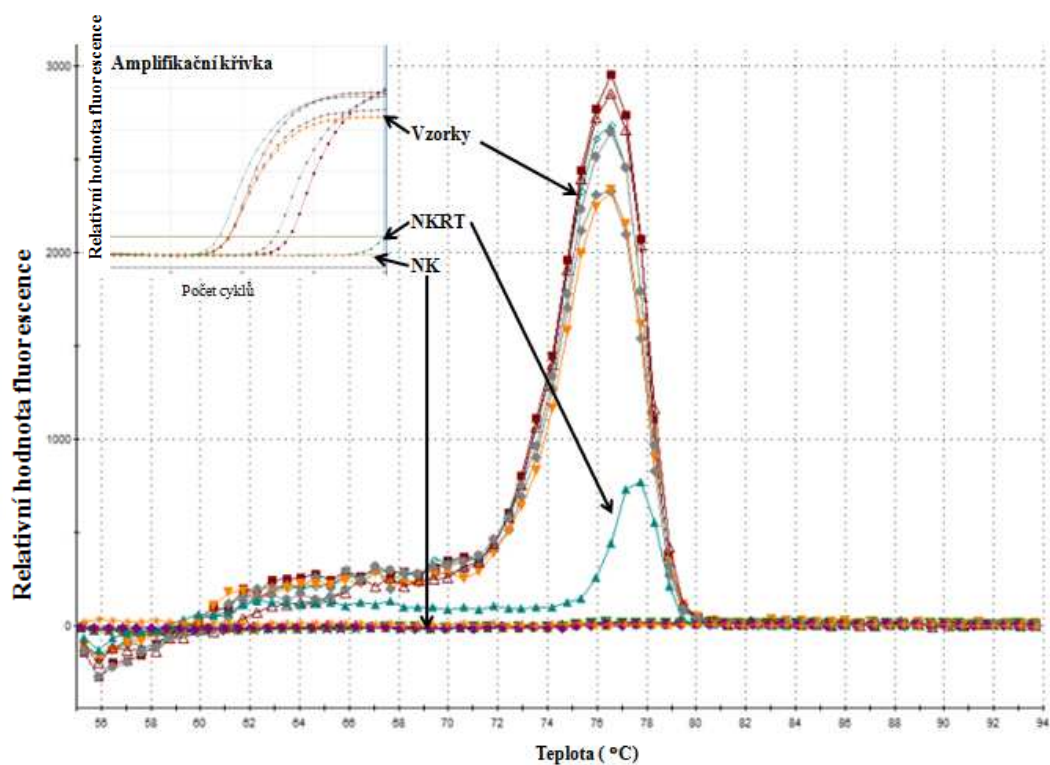
Obr. 5.11. Disociační křivka vzorků SL65 – SL70 při kvantifikaci miR-10b.

NK – negativní PCR kontrola, NKRT – negativní kontrola reverzní transkripce.



Obr. 5.12. Disociační křivka vzorků SL65 – SL70 při kvantifikaci miR-21.

NK – negativní PCR kontrola, NKRT – negativní kontrola reverzní transkripce.



Obr. 5.13. Disociační křivka vzorků SL65 – SL70 při kvantifikaci RNU6b.

NK – negativní PCR kontrola, NKRT – negativní kontrola reverzní transkripce.

Na příkladu kvantifikace referenčního genu RNU6b na Obr. 5.13 se nespecificky amplifikovala negativní kontrola reverzní transkripce. Analýzou disociační křivky bylo odhaleno, že se nejedná o shodný produkt a na výsledky Ct hodnot vzorků to tedy nemá vliv.

Závěr zjištění specifity primérů: Na podskupině několika vzorků byla ověřena specifita primérů pro miR-21, miR-10b a RNU6b. Analýza disociační křivky byla přidána k optimalizovanému teplotnímu programu a zařazena ke všem rutinním analýzám.

5.2.4 Návrh výpočtu exprese miRNA s ohledem na množství nádorových buněk ve vzorku

Získaná data o expresi miRNA z qRT-PCR se musí pro budoucí účely normalizovat nejen na referenční gen RNU6b, ale také na zastoupení nádorových buněk ve vzorku. K tomuto výpočtu je nutné znát relativní exprese daných miRNA ve zdravých tkáních.

Pro tyto účely jsem vybrala gen *KRAS*, jehož mutace jsou přítomny pouze v nádorových buňkách (TADA *et al.* 2002, TAKAHASHI *et al.* 2005, SALEK *et al.* 2007, BOURNET *et al.* 2009). Analýzou mutací pomocí heteroduplexní analýzy na DCE je možno vypočítat procentuální zastoupení mutovaných buněk ve vzorku (Rovnice 5.1).

Rovnice 5.1. Zastoupení mutovaných buněk (ZMB).

Výpočet na základě plochy hrotu (A) z elektroforegramu při heteroduplexní analýze, kde $homMUT$ a $homDT$ zastupují plochy hrotů detekovaného fragmentu mutančního nebo divokého typu, $het1$ a $het2$ zastupují plochy detekovaných fragmentů heteroduplexů. Celá rovnice je vynásobená dvěma, protože v buňce postačí pouze jedna mutovaná alela k vyjádření onkogenního potenciálu *KRAS*.

$$ZMB = \frac{A_{homMUT} + \frac{A_{het1} + A_{het2}}{2}}{A_{homMUT} + A_{homDT} + A_{het1} + A_{het2}} \cdot 2$$

Vypočítané zastoupení mutovaných buněk ve vzorku poté může posloužit k celkovému výpočtu relativní exprese miRNA (jeden z návrhů je ukázán v Rovnici 5.2). Této problematice se věnuje kapitola 6 Diskuze.

Rovnice 5.2. Výpočet relativní exprese miRNA normalizované na referenční gen, zdravou tkáň a zastoupení mutovaných buněk (ZMB) ve vzorku.

Ct značí hodnotu cyklu při dané konstantní hodnotě fluorescence pro všechna měření. Exprese miRNA ve zdravé tkáni vztážená na referenční gen by měla být získána ze zdravé tkáně pankreatu stejného pacienta. Vzorec je odvozen od standardně používaného vzorce pro výpočet exprese miRNA (vzorec $2^{-\Delta\Delta Ct}$).

$$\text{Relativní exprese miRNA} = \frac{2^{-[Ct(\text{miRNA v nádorové tkáni}) - Ct(\text{referenční gen})]} - (1 - ZMB) \cdot 2^{-[Ct(\text{miRNA ve zdravé tkáni}) - Ct(\text{referenční gen})]}}{ZMB}$$

5.3 Analýzy klinických vzorků

Pro následné analýzy bylo zařazeno celkem 110 vzorků získaných metodou EUS-FNB (viz 4.1 Pacienti). Příklad typického vzhledu a velikosti získaných vzorků je ukázán na Obr. 5.14. Žádný ze vzorků se nepodařilo histologicky posoudit. Vzorky zdravých tkání nebyly získány.



Obr. 5.14. Příklad typického vzhledu a velikosti vzorků z EUS-FNB.

5.3.1 Ověření laboratorního postupu pro izolaci NK

Pro ověření správnosti izolace NK jsem považovala koncentraci NK vyšší než $0,05 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, tedy fluorometricky detekovatelnou koncentraci (Tab. 5.6).

Tab. 5.6. Koncentrace NK u všech analyzovaných vzorků.

Data byla získána pomocí fluorometrie přístrojem Qubit 2.0 Fluorometer s použitím souprav Qubit RNA HS Assay kit a Qubit DNA HS Assay kit (Life Technologies, USA) (naměřeno Mgr. Terezou Hálkovou, Genomac International s.r.o.). Červeně jsou znázorněny koncentrace NK nižší než $0,05 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

Koncentrace [ng·μl ⁻¹]			Koncentrace [ng·μl ⁻¹]			Koncentrace [ng·μl ⁻¹]			Koncentrace [ng·μl ⁻¹]		
Vzorek	RNA	DNA	Vzorek	RNA	DNA	Vzorek	RNA	DNA	Vzorek	RNA	DNA
SL1	6,00	2,61	SL31	11,90	0,22	SL61	24,40	<0,05	SL91	9,24	0,16
SL2	6,49	15,80	SL32	9,11	0,32	SL62	11,90	0,17	SL92	11,20	0,18
SL3	<0,05	0,58	SL33	19,10	0,89	SL63	13,20	0,89	SL93	6,80	0,28
SL4	<0,05	5,16	SL34	7,02	0,43	SL64	<0,05	0,28	SL94	4,80	0,08
SL5	54,00	19,30	SL35	<0,05	0,17	SL65	14,70	3,07	SL95	13,00	0,12
SL6	14,90	25,00	SL36	42,30	1,13	SL66	4,96	<0,05	SL96	5,71	0,37
SL7	75,00	6,73	SL37	<0,05	0,13	SL67	6,80	0,12	SL97	9,44	0,26
SL8	18,10	10,00	SL38	8,86	0,14	SL68	25,90	1,20	SL98	8,51	0,76
SL9	23,40	9,83	SL39	<0,05	1,21	SL69	7,42	0,54	SL99	2,30	0,54
SL10	32,90	6,90	SL40	2,78	0,87	SL70	6,05	1,47	SL100	<0,05	0,10
SL11	29,40	0,94	SL41	7,19	0,28	SL71	6,63	1,21	SL101	2,22	1,55
SL12	16,60	0,45	SL42	7,57	0,20	SL72	3,21	0,07	SL102	16,10	0,19
SL13	9,17	<0,05	SL43	9,03	0,30	SL73	2,30	5,69	SL103	8,05	0,95
SL14	61,00	3,19	SL44	9,47	0,13	SL74	8,19	0,15	SL104	3,61	0,60
SL15	23,40	12,20	SL45	4,50	0,58	SL75	<0,05	0,14	SL105	2,30	0,12
SL16	12,80	8,01	SL46	5,21	0,32	SL76	7,94	0,51	SL106	3,30	1,86
SL17	23,10	2,99	SL47	55,00	0,40	SL77	9,62	0,06	SL107	7,15	0,48
SL18	8,31	7,79	SL48	8,59	0,22	SL78	9,65	<0,05	SL108	6,73	0,37
SL19	2,40	0,06	SL49	5,86	0,07	SL79	3,64	1,72	SL109	6,21	2,43
SL20	3,12	0,08	SL50	2,63	0,78	SL80	2,94	0,08	SL110	<0,05	0,56
SL21	9,73	0,35	SL51	<0,05	0,07	SL81	3,44	0,68			
SL22	2,95	0,36	SL52	2,68	0,41	SL82	11,40	0,23			
SL23	5,04	4,15	SL53	6,83	<0,05	SL83	<0,05	0,09			
SL24	9,68	0,14	SL54	<0,05	0,22	SL84	18,40	0,08			
SL25	<0,05	0,34	SL55	5,77	8,25	SL85	<0,05	0,14			
SL26	8,90	0,25	SL56	<0,05	5,18	SL86	17,00	0,66			
SL27	4,06	0,13	SL57	10,60	0,44	SL87	2,20	<0,05			
SL28	<0,05	0,78	SL58	<0,05	<0,05	SL88	2,61	0,08			
SL29	<0,05	0,06	SL59	13,20	0,38	SL89	<0,05	0,21			
SL30	4,26	0,08	SL60	19,60	4,09	SL90	2,40	0,33			

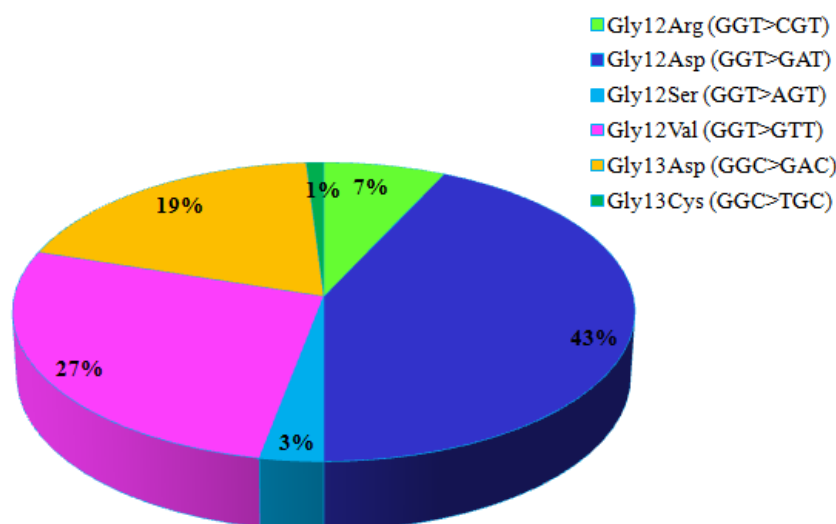
Závěr ověření laboratorního postupu pro izolaci NK: Měřitelná koncentrace NK (tzn. koncentrace vyšší než $0,05 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) byla u 83 % vzorků RNA a 94 % vzorků DNA. U zbývajících vzorků nebyly NK potvrzeny, avšak i tyto vzorky byly zařazeny do analýz mutace v *KRAS* a analýz expresí miRNA.

5.3.2 Analýza mutací v genu *KRAS*

Ze všech vzorků se mi podařilo získat dostatek DNA pro mutační analýzy, tedy i z těch, v nichž nebyla detekována DNA fluorometricky. Analýzou heteroduplexů na DCE jsem zjistila přítomnost mutace v *KRAS* u 74 vzorků. Závěry detekce mutací v *KRAS* v závislosti na stanovené diagnóze shrnuje Tab. 5.7, druhy nalezených mutací jsou ukázány na Obr. 5.15.

Tab. 5.7. Počet vzorků s detekovanou mutací v 2. exonu genu *KRAS* v závislosti na stanovené diagnóze.

Pacienti	Počet vzorků	Počet vzorků s mutací v <i>KRAS</i>
Všichni zařazení pacienti	110	74 (67 %)
Pacienti s diagnózou KP (PDAC)	85	67 (78 %)
Pacienti s diagnózou CHP	16	4 (25 %)
Pacienti s nestanovenou diagnózou	9	3 (33 %)



Obr. 5.15. Shrnutí výsledků analýz mutací v *KRAS*.

Výšečový graf shrnuje druhy potvrzených mutací a jejich četnost v procentech z celkového počtu 74 vzorků s nalezenou mutací v *KRAS*.

Mutace v *KRAS* se vyskytovaly jak u pacientů s potvrzenou diagnózou KP, tak u pacientů s CHP a pacientů s nejasnou diagnózou. Nejčastějšími typy mutací byly záměnové mutace v exonu 2 kodonu 12 z glycinu na kyselinu asparagovou nebo valin.

Další tabulka (Tab. 5.8) uvádí konkrétní vzorky s potvrzenou či nepotvrzenou mutací v *KRAS* a konkrétní vypočítané zastoupení mutovaných buněk ve vzorku. Pro výpočet jsem použila navrženou rovnici (Rovnice 5.1 v kapitole 5.2.4), do které jsem pro zjednodušení dosazovala místo ploch hrotů jejich výšky. Mezi velmi kvalitní vzorky s vysokým množstvím nádorových buněk jsem zařadila vzorky s více než 80 % ZMB.

Tab. 5.8. Mutace v *KRAS* u konkrétních vzorků a průměrné zastoupení mutovaných buněk (ZMB) ve vzorcích s nalezenou mutací.

Měřeno ve dvou paralelách pomocí heteroduplexní analýzy na DCE. Hodnoty ZMB v paralelách se od sebe nelišily o více než 3 % a výsledné hodnoty slouží pro účely této diplomové práce jako orientační. Červeně je znázorněno ZMB menší než 20 %, zeleně větší než 80 %. + Potvrzená mutace, - nepotvrzená mutace v *KRAS*.

Vzorek	KRAS	ZMB	Vzorek	KRAS	ZMB	Vzorek	KRAS	ZMB	Vzorek	KRAS	ZMB
SL1	+	68 %	SL31	+	87 %	SL61	-		SL91	+	74 %
SL2	+	79 %	SL32	+	21 %	SL62	+	65 %	SL92	+	100 %
SL3	+	61 %	SL33	+	43 %	SL63	+	26 %	SL93	+	100 %
SL4	-		SL34	+	14 %	SL64	+	17 %	SL94	+	97 %
SL5	+	48 %	SL35	-		SL65	-		SL95	-	
SL6	+	60 %	SL36	+	30 %	SL66	+	86 %	SL96	+	62 %
SL7	+	35 %	SL37	-		SL67	-		SL97	+	6 %
SL8	+	73 %	SL38	-		SL68	+	38 %	SL98	+	48 %
SL9	+	57 %	SL39	-		SL69	+	26 %	SL99	+	44 %
SL10	+	7 %	SL40	+	19 %	SL70	-		SL100	+	91 %
SL11	+	32 %	SL41	-		SL71	+	70 %	SL101	-	
SL12	-		SL42	+	43 %	SL72	-		SL102	+	31 %
SL13	-		SL43	-		SL73	-		SL103	+	36 %
SL14	-		SL44	+	22 %	SL74	+	72 %	SL104	+	92 %
SL15	+	50 %	SL45	+	59 %	SL75	-		SL105	+	19 %
SL16	+	56 %	SL46	-		SL76	+	100 %	SL106	+	76 %
SL17	+	16 %	SL47	+	100 %	SL77	-		SL107	+	60 %
SL18	+	19 %	SL48	-		SL78	-		SL108	+	9 %
SL19	+	39 %	SL49	-		SL79	-		SL109	+	100 %
SL20	+	44 %	SL50	+	10 %	SL80	-		SL110	+	62 %
SL21	-		SL51	+	48 %	SL81	-				
SL22	-		SL52	+	99 %	SL82	-				
SL23	+	11 %	SL53	+	12 %	SL83	-				
SL24	+	45 %	SL54	+	60 %	SL84	+	71 %			
SL25	-		SL55	+	30 %	SL85	+	37 %			
SL26	+	80 %	SL56	-		SL86	+	8 %			
SL27	+	16 %	SL57	+	5 %	SL87	-				
SL28	+	14 %	SL58	+	5 %	SL88	+	16 %			
SL29	+	8 %	SL59	+	93 %	SL89	-				
SL30	-		SL60	+	100 %	SL90	+	100 %			

Pouze u 14 vzorků bylo ZMB vyšší nebo rovno 80 % a u 19 vzorků nedosahovalo ani 20 %. Z těchto dat lze vyčíst také vysokou variabilitu získaných vzorků, a jak je proto důležité změřené exprese miRNA korelovat se zastoupením nádorových buněk.

Závěr analýzy mutací v genu *KRAS*: Úspěšnost heteroduplexní analýzy *KRAS* byla úspěšná u všech vzorků (tedy 100%). Mutace v *KRAS* byla nalezena u 67 % všech vzorků. Diagnóza KP byla potvrzena u 78 % vzorků pacientů, kteří byli takto diagnostikováni na základě posouzení lékaře a cytologa. Zastoupení mutovaných buněk bylo napříč vzorky velmi variabilní.

5.3.3 Ověření laboratorního postupu pro qRT-PCR

Laboratorní postup pro qRT-PCR jsem ověřovala u vzorků s nalezenou mutací v *KRAS*. Správný průběh qRT-PCR byl takový, že u vzorků nebyly nalezeny odchylky v disociačních křivkách, jejich Ct mělo hodnotu od 15 do 30 cyklů a vzájemné paralely se od sebe nelišily o více než 0,5 cyklů. V případě, že se tak stalo, byl postup qRT-PCR opakován. Konkrétní hodnoty Ct vzorků jsou uvedeny v Tab. 5.9.

Tab. 5.9. Hodnoty Ct RNU6b, miR-21 a miR-10b u vzorků s mutací v *KRAS*.

Hodnoty Ct jsou průměrem minimálně dvou paralelních měření, které se od sebe neliší o více než 0,5 cyklu a pro účely této diplomové práce slouží jako orientační. Červeně jsou zvýrazněny hodnoty Ct větší než 30 cyklů, červeným rámečkem jsou označeny vzorky, u kterých byla fluorometricky detekována koncentrace RNA nižší než 0,05 ng·μl⁻¹. Ct bylo měřeno při normalizované relativní hodnotě fluorescence rovnající se 400.

Vzorek	Ct RNU6b	Ct miR-21	Ct miR-10b	Vzorek	Ct RNU6b	Ct miR-21	Ct miR-10b
SL1	20,78	21,79	26,55	SL55	21,02	23,13	26,27
SL2	19,37	25,39	29,91	SL57	20,79	25,44	28,84
SL3	23,42	23,83	29,68	SL58	26,49	28,77	32,09
SL5	15,97	20,00	22,99	SL59	18,37	21,46	23,79
SL6	21,82	21,71	26,94	SL60	16,91	21,84	22,74
SL7	16,39	17,90	20,86	SL62	18,70	21,15	23,24
SL8	19,87	20,55	24,70	SL63	18,92	21,81	23,53
SL9	19,17	21,43	23,75	SL64	24,05	25,28	30,96
SL10	20,38	22,64	26,43	SL66	19,08	23,39	27,64
SL11	15,89	19,93	20,46	SL68	18,47	20,87	23,73
SL15	19,29	20,43	23,75	SL69	21,76	23,73	26,15
SL16	17,32	20,40	24,62	SL71	19,89	20,37	24,32
SL17	16,64	19,72	24,74	SL74	18,66	19,84	25,06
SL18	18,59	19,47	25,95	SL76	18,11	21,79	26,13
SL19	23,15	23,77	27,43	SL84	18,06	19,83	23,97
SL20	22,06	19,85	25,75	SL85	22,39	23,53	28,43
SL23	20,11	21,83	27,42	SL86	19,23	21,04	27,22
SL24	17,59	20,15	25,05	SL88	22,33	23,57	28,04
SL26	17,37	20,08	24,71	SL90	24,49	22,32	26,87
SL27	22,96	26,39	26,55	SL91	17,31	19,55	22,89
SL28	25,91	28,11	37,20	SL92	21,35	20,92	25,20
SL29	23,03	24,24	28,19	SL93	19,62	20,60	24,83
SL31	19,17	19,48	23,87	SL94	20,44	21,02	25,21
SL32	18,34	21,26	26,24	SL96	18,60	20,78	25,63
SL33	23,44	24,24	28,65	SL97	17,48	21,56	22,69
SL34	20,42	18,70	24,43	SL98	17,60	20,29	23,67
SL36	17,74	19,57	23,48	SL99	21,18	21,51	26,68
SL40	23,12	25,45	28,33	SL100	30,99	27,04	33,88
SL42	20,56	23,37	27,92	SL102	16,56	19,68	23,17
SL44	19,95	25,40	28,12	SL103	19,41	21,02	25,32
SL45	21,18	24,11	27,37	SL104	20,53	22,56	26,89
SL47	16,11	21,75	25,38	SL105	21,73	21,36	26,55
SL50	22,12	24,26	28,23	SL106	19,34	24,55	29,81
SL51	27,21	25,02	29,31	SL107	20,40	26,06	30,30
SL52	22,15	23,79	28,81	SL108	20,28	22,69	26,34
SL53	22,97	21,84	25,11	SL109	17,79	21,44	25,33
SL54	18,98	23,56	24,62	SL110	27,88	29,43	32,67

Podařilo se mi naměřit Ct hodnoty u všech vzorků. Kontrolou disociačních křivek byly vždy ihned odhaleny případné chyby a pokus opakován. Hodnota Ct vyšší než 30 cyklů byla detekována u poloviny vzorků (převážně u miR-10b), u nichž nebyla naměřena RNA pomocí fluorometru.

Závěr ověření laboratorního postupu pro qRT-PCR: Funkčnost celého postupu jsem ověřila s úspěšností 100 % u miR-21, 99 % u RNU6b a 93 % u miR-10b. Vzhledem k velkému množství analyzovaných vzorků a velmi malému počtu vzorků s nízkou (nebo žádnou) koncentrací RNA je optimalizovaný postup pro kvantifikaci miRNA ze vzorků FNB ověřený a vhodný pro další analýzy miRNA ze vzorků EUS-FNB.

6 Diskuze

Metoda odběru vzorků KP pomocí EUS-FNB s následnou analýzou expresí miRNA má velký potenciál pro využití v klinické praxi, které by mohlo vést k časné diagnostice, odhadu prognózy a sledování progresu a vlivu léčebné terapie. Jak již bylo popsáno v teoretické části této práce, laboratorní metodika pro stanovení miRNA a množství odebrané nádorové tkáně není doposud zdaleka rutinní záležitostí a provádí ji jen hrstka laboratoří z celého světa.

▪ Optimalizace laboratorního postupu

Cílem práce byla především optimalizace laboratorního postupu pro kvantifikaci miRNA z těchto vzorků. V naší laboratoři šlo také o celkové zavedení práce s RNA a miRNA a obnovu qPCR metody. Proto bylo potřeba nejdříve navrhnout, jak bude celý experiment probíhat. Pro přibližné stanovení nádorových buněk ve vzorku jsme analyzovali gen *KRAS*. K tomu jsme ze vzorku tedy museli izolovat nejen RNA, ale také DNA. Z důvodu co nejnižšího zkreslení výsledků ZMB a expresí miRNA jsme se rozhodli, že budeme nejdříve izolovat RNA a následně DNA, a to z lyzátu původního vzorku. Pro naše účely nepřicházela v úvahu možnost rozpůlení původního vzorku, a to kvůli malé velikosti a velmi velké pravděpodobnosti jiného zastoupení nádorových buněk v každé z polovin vzorku. Další možností by byla izolace DNA i RNA najednou z jednoho vzorku s následným ošetřením poloviny získaných NK DNázou (pro získání RNA) a druhé poloviny RNázou (pro získání DNA). Tímto způsobem bychom však přišli o polovinu množství získané RNA, což by z takto malých vzorků mohlo vést k nemožnosti dále analyzovat miRNA. Vzhledem k vysoké citlivosti metody heteroduplexní analýzy by nižší množství DNA nejspíše nevadilo, zvláště bereme-li v úvahu, že v našem navrženém schématu experimentů získáváme pravděpodobně ještě nižší výtěžky DNA, jelikož jsou tyto izolovány pouze ze 100 µl lyzátu.

Za účelem dosažení co nejvyšších výtěžků RNA jsem porovnávala 4 druhy komerčních souprav pro izolaci RNA. Hledali jsme takovou soupravu, jejíž postup by nebyl metodicky, materiálově ani časově příliš náročný, jejíž cena by byla pro laboratoř únosná, a především, jejíž pomocí bychom získali co nejvyšší výtěžky a kvalitu NK. Tyto podmínky nejlépe splňovala vybraná souprava I1. Ačkoliv byla souprava I1 dražší v porovnání s ostatními soupravami, její pracovní postup byl poměrně jednoduchý a rychlý i při izolaci

RNA z více vzorků. Rozhodující však byla vysoká kvalita a výtěžek získaných NK. Jelikož jsem v rámci optimalizace izolace NK vzorky EUS-FNB rozdělovala na přibližně stejné díly pro možnost porovnání souprav na jednom vzorku, nelze koncentrace získaných NK srovnávat absolutně. Kvalitu NK jsem vyhodnocovala na základě amplifikace standardních genů, a to především z důvodu ověření schopnosti dále analyzovat izolované NK. V době, kdy jsem kvalitu (ale také výtěžky) RNA ověřovala pomocí amplifikace genů *GA733-2*, *CEA*, *EGFR* a *ACTB*, jsme neměli k dispozici žádné priméry pro miRNA. Proto byly zvoleny priméry právě pro tyto geny, které v naší laboratoři standardně využíváme k jiným účelům. Kvalita a výtěžek amplifikátů genu *KRAS* byla u všech použitých souprav srovnatelná. Z toho mohu vyvodit závěr, že v získaných lyzátech zůstalo dostatek DNA pro izolaci a pravděpodobně v něm nebyla přítomna žádná chemikálie, která by působila jako výrazný inhibitor při izolaci DNA.

Naším záměrem nebyla pouze vysoká kvalita a výtěžek RNA, ale také cDNA. Pro optimalizaci reverzní transkripce jsem si zvolila k porovnání 4 druhy komerčních souprav, které jsem hodnotila podobně jako soupravy pro izolaci NK, tedy podle vstupních a výstupních parametrů. Do hodnocení vstupních parametrů jsem přidala také počet kroků. Zvyšující se počet kroků vyžadoval nejen vyšší počet přesného dodržení času inkubace, ale také s sebou nesl vyšší riziko kontaminace vzorku při opakovaném otevírání a manipulaci s mikrozkmavkou. Naprosto nevýhodnou pro naše účely byla souprava RT4, která byla několikanásobně dražší než ostatní soupravy a byla metodicky i časově náročnější. Při amplifikaci genů *GA733-2*, *CEA*, *EGFR* a *ACTB* vznikaly u vzorků při použití soupravy RT4 nespecifické produkty, na rozdíl od vzorků při použití souprav RT1 a RT3. To mohlo být zapříčiněno fragmentovanou cDNA nebo špatnými podmínkami při PCR. Souprava RT1 byla relativně levná, metodicky nenáročná, časově přijatelná a po amplifikaci genu *ACTB* vznikaly kvalitní produkty se srovnatelně nejvyššími výtěžky. Souprava RT2 byla z testovaných nejlevnější a její postup nejméně časově náročný. Celá optimalizace laboratorního postupu byla dlouhodobým a postupným procesem, kdy jsme neustále testovali nové možnosti. Jedním z příkladů bylo také použití soupravy RT2, kterou jsme se rozhodli otestovat až po výběru soupravy RT1 a testech na qPCR cykléru. Proto jsem nehodnotila výstupní parametry pro použití soupravy RT2 a pokusila se srovnat soupravy RT1 a RT2 pomocí qPCR a hodnotit qRT-PCR jako celek. Optimalizace izolace NK a reverzní transkripce se neobešla bez srovnání všech izolačních a RT souprav (kromě RT2) mezi sebou. Tyto výsledky nejsou v diplomové práci pro lepší přehlednost uvedeny. Z výsledků porovnání všech kombinací souprav jsem si ověřila, že kombinace I1 a RT1 se jeví jako nejlepší.

Posledním a neméně důležitým krokem byla optimalizace qPCR. Nejdříve jsem si vybrala vhodnou kombinaci RT a qPCR soupravy, a to na základě průběhu amplifikační křivky a co nejnížší hodnoty Ct. Průběh amplifikační křivky by měl být v převážné části jasně exponenciální bez případných větších „hrbolů“, které by mohly naznačovat amplifikaci dalšího rozdílného produktu. Nízká hodnota Ct byla důležitá hlavně z důvodu zachytu i minimálně koncentrovaných miRNA ve vzorcích. Srovnáním hodnot Ct mezi použitím kombinací RT a qPCR souprav jsem byla schopna zjistit, která souprava je vhodnější pro získání koncentrovanější cDNA a která je vhodnější pro analýzu exprese miRNA. Z prezentovaných výsledků vyplývá nejvhodnější použití souprav RT2 a Q2, tedy souprav od stejného výrobce. Výsledky po použití těchto souprav také naznačují, že cDNA je koncentrovanější a reakční směs pro qPCR je kvalitnější než u souprav RT1 a Q1. Nabízí se také hypotéza kvalitněji a specifitěji navrženého univerzálního priméru u soupravy RT2. Reakční směs pravděpodobně obsahuje také velmi kvalitní *hot start* polymerázu a ideální koncentraci dalších látek potřebných pro její enzymatickou aktivitu. Při pokusu analyzovat RNU6b se shodným nastavením PCR programů pro oba typy souprav, tedy RT1 s Q1 a RT2 s Q2, se rozdíly mezi soupravami ještě více prohloubily. Ačkoli jsem chtěla zajistit pro porovnání stejné podmínky, zvýšením teploty pro nasedání primérů o 2 °C u soupravy Q1 jsem mohla dosáhnout menší účinnosti jejich nasedání. U soupravy Q2 jsem naopak mohla snížením o 3 °C zajistit větší účinnost a menší specifitu nasedání primérů. Tato skutečnost by částečně vysvětlovala rozdíly mezi hodnotami Ct, ale nikoli však v takové míře. Navíc jsem prodloužila délky působení jednotlivých teplot PCR programu u soupravy Q2. Přestože nebylo nezbytně nutné původní protokol soupravy Q2 nijak obměňovat, zjistila jsem, že při prodloužení délek působení teplot PCR programu dochází ke snížení Ct hodnot. Je velice pravděpodobné, že se tak děje z důvodu delšího času pro polymeraci v každém cyklu a je tak amplifikována většina denaturovaných vláken miRNA v sekvenci cDNA.

V rámci optimalizací jsem také testovala stabilitu získané cDNA. V případě, že budeme v budoucnu kvantifikovat miRNA rutinně a ve větším množství, je důležité, aby déle skladované vzorky cDNA byly vhodné pro další (například opravné nebo dodatečné) qPCR analýzy. Musela jsem tedy zjistit, při jaké teplotě a jaká doba skladování ještě neovlivní kvalitu cDNA natolik, aby zkreslila získané výsledky. Brala jsem v úvahu také opakované měnění teploty při manipulaci. Zjistila jsem, že ani po 2 měsících skladování v chladícím nebo mrazícím zařízení se nezměnila kvalita cDNA pro testované miRNA a RNU6b.

Dále jsem stanovovala účinnost primérů pomocí analýzy standardní (kalibrační) křivky, tedy, zda při každé koncentraci templátu dochází ke zdvojnásobení produktů

po každém cyklu. Tento test se provádí na základě ředící řady vstupního templátu, kdy jsou výsledné hodnoty Ct proloženy lineární přímkou. Směrnice přímky a hodnota R_{sq} (proložení všech bodů kalibrační křivky, angl. *amplification efficiency value*) poté udává účinnost reakce (BUSTIN *et al.* 2009). Naměřené účinnosti byly při počtu osmi měření pro každý primér vždy vyšší než 76 %. Při stanovování účinnosti standardních genů je dosahováno účinností až 100 %. Při měření miRNA se však účinnost nedá příliš ovlivnit. MiRNA obsahují tak málo nukleotidů, že jsou jejich priméry navrženy přes celou jejich sekvenci. Výjimkou je RNU6b. U této snRNA by bylo možné navrhnout takovou sekvenci, která by zvýšila účinnost amplifikace. Jedinými možnostmi jsou v tomto případě vyšší koncentrace primérů nebo zvýšení teploty pro jejich nasedání. To by však mohlo vést ke snížené specifitě reakce. Nejspíše tedy bude ještě nutné optimalizovat qPCR pro každý primér zvlášť.

Jedním z dalších cílů mé práce bylo také zjišťování specifity primérů, a tedy i naměřených Ct hodnot. Specifita naměřených Ct hodnot, zejména při použití nespecifických substrátů jako je SYBR green, musí být vždy ověřena křivkou tání (disociační křivkou). Po dokončení všech cyklů PCR jsou produkty denaturovány vysokou teplotou, následně renaturovány ochlazením a znovu denaturovány zvyšováním teploty, přičemž je v celém průběhu zvyšování teploty zaznamenávána fluorescence. Zlogaritmováním hodnot naměřených fluorescencí a vynesením do grafu lze kontrolovat, zda byl amplifikován pouze jeden produkt, zda vznikají vedlejší produkty, nebo se jednalo o produkt rozdílný (BUSTIN *et al.* 2009). V této práci jsem ukázala několik příkladů analýz disociační křivky pro každý primér. Tento test je nezbytný pro jakékoli měření expresí pomocí qPCR, a tak jsem jej v rámci optimalizací zařadila ke všem dalším analýzám.

▪ Návrh řešení výpočtu expresí miRNA s ohledem na množství nádorových buněk ve vzorku

Jak už bylo uvedeno v kapitolách o problematice analýz miRNA ze vzorků EUS-FNB, je nutné změřené exprese miRNA normalizovat nejen na referenční gen, ale také na množství nádorových buněk ve vzorku. Naprostá většina publikací, která měřila exprese miRNA u KP a kterou jsem citovala v této práci, pracovala při výpočtu expresí se standardně používaným vzorcem $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Tento vzorec v sobě zahrnuje normalizaci exprese miRNA na referenční gen a zdravou tkáň získanou ve většině případů ze zdravých jedinců. To, že je vzorek složen nejen z nádorových buněk, a hlavně z jakého množství, je u těchto studií zanedbáno a změřené exprese jsou považovány za exprese miRNA v nádoru.

Charakter tkáně celého pankreatu, ať už morfologický, funkční či enzymatický, je vlivem nádoru zcela rozdílný od tkáně zdravých jedinců (HEZEL *et al.* 2006). Bohužel jsem nenalezla studii, která by srovnávala expresi miRNA z pankreatu zdravých jedinců a zdravé tkáně pankreatu pacientů postižených nádorem. Tyto exprese by mohly být rozdílné a mohly by se lišit mezi jedinci. Z tohoto důvodu je dle mého názoru nesprávné používat zmíněný vzorec při analýzách expresí miRNA u KP, i v případě, že víme, že analyzovaný vzorek obsahuje pouze nádorovou tkáň. Na druhou stranu jsem zde prezentovala mnoho dat ze studií, které našly diagnostické a prognostické miRNA, i po použití tohoto výpočtu. Otázkou však zůstává, jak moc tyto výsledky odpovídají skutečnosti. Pro budoucí účely je nutné srovnat exprese miRNA z tkání pankreatu zdravých jedinců, ze zdravých tkání pacientů s KP a CHP, z tkání z okolí nádoru a z tkání okolo zánětu, aby mohla být vyloučena možnost, že jsou tyto exprese výrazně rozdílné. Neposledním problémem je také charakter nádorového stromatu, jehož buňky mohou mít opět rozdílně exprimované miRNA. Řešením by byla mikrodisekce vzorků a následná analýza miRNA, což je také dalším cílem naší laboratoře.

V naší laboratoři se tomuto problému intenzivně věnujeme a bohužel jsme stále nedospěli k jeho řešení. Pro výpočet zastoupení nádorových buněk jsme navrhli využití analýzy mutací v genu *KRAS* pomocí heteroduplexní analýzy. Navržený vzorec ve výsledkové části vychází z výsledků DCE a jeho pomocí bychom měli spolehlivě vypočítat ZMB u vzorků s nalezenou mutací v *KRAS*. Mutace v genu *KRAS* by měly se 100 % specifitou poukazovat na KP (TADA *et al.* 2002, TAKAHASHI *et al.* 2005, SALEK *et al.* 2007, BOURNET *et al.* 2009). Mutace se objevují již v raných stádiích PanIN a jsou zastoupeny u více než 70 % případů KP (ALMOGUERA *et al.* 1988, LI a JIAO 2003, SALEK *et al.* 2007, SALEK *et al.* 2009 cancer.sanger.ac.uk/cosmic). Diskutabilní je, zda všechny nádorové klony obsahují mutaci v *KRAS* a zda tento mutovaný gen není navíc ještě amplifikován. Tyto skutečnosti věrohodnost vypočteného ZMB značně zpochybňují. Riziko nesprávného výpočtu vlivem amplifikace genu se dá zabránit dalšími analýzami, například analýzou MLPA pro detekci počtu kopií (*multiplex ligation probe amplification*). Velmi důležité je také dostatečné množství opakování heteroduplexní analýzy a nalezení vhodného počítačového programu, který je schopen vypočítat plochy hrotů ze získaných dat z DCE. U pacientů, kde nebyla nalezena mutace v *KRAS*, není vyloučen KP. U těchto pacientů by bylo pro výpočet ZMB vhodné nalézt další mutovaný protoonkogen nebo tumor supresorový gen s podobnými vlastnostmi jako *KRAS* (specifita, přítomná mutace již v časných stádiích KP apod.).

V případě, že bychom tedy znali ZMB, mohli bychom výsledky expresních analýz miRNA normalizovat vzhledem k množství nádorových buněk. Navrhla jsem vzorec, který by byl teoreticky použitelný v praxi. K tomu by však bylo nutné znát expresi miRNA ve zdravé tkáni (tedy tkáni v okolí nádoru) téhož pacienta. Zde by neměla být detekována žádná mutace v *KRAS* a lékař by měl jasně poznat, že se nejedná o tkáň nádoru, což je poměrně nelehký úkol. Problémem je také lékařská etika, kdy je nevhodné odebírat vzorky ze zdravých tkání a podporovat tím další riziko zánětu. To je také důvodem, proč se nám doposud nepodařilo získat vzorky zdravých tkání.

▪ **Ověření laboratorních postupů**

Získané vzorky z EUS-FNB jsou pro nás velmi vzácné, a tak jsem jich na optimalizaci postupů využila jen velmi málo. Z toho důvodu bylo nutno ověřit celou optimalizovanou metodiku na větší skupině vzorků, s jejichž výsledky bychom mohli pracovat i v budoucnu.

Ověřila jsem tedy, že vybraným postupem pro izolaci NK lze ze všech vzorků získat dostatek DNA pro další analýzy. U vzorků jsem analyzovala mutace v *KRAS*, z nichž 67 % bylo na mutaci pozitivních. Tímto jsem ověřila diagnózu KP u 78 % pacientů, kteří byli diagnostikováni již lékařem a cytologem. Čtvrtina pacientů, u kterých byla diagnostikována CHP, a třetina pacientů, kteří neměli stanovenou diagnózu, se objevila také mutace v *KRAS*. Podle literatury se může pravděpodobně jednat o karcinomy (TADA *et al.* 2002, TAKAHASHI *et al.* 2005, SALEK *et al.* 2007, BOURNET *et al.* 2009). I kdyby analýza *KRAS* nakonec nebyla využita pro výpočet expresí miRNA, jednoznačně není zbytečná a pomáhá upozornit na případný KP.

Dále jsem vypočítala ZMB u vzorků s nalezenou mutací v *KRAS*. Bohužel jsem neměla k dispozici vhodný program pro výpočet ploch hrotů, a tak jsem výpočet zjednodušila a použila jejich výšky. Kvůli této skutečnosti a také kvůli malému počtu měření jsem výsledky statisticky nezpracovávala. Ze získaných dat o přibližném ZMB lze vyčíst, jak vysoká byla variabilita získaných vzorků, a jak je proto důležité změřené exprese miRNA korelovat se zastoupením nádorových buněk.

Detekovatelnou koncentraci RNA na fluorometru jsem získala pouze u 83 % vzorků. Laboratorní postup pro qRT-PCR jsem ověřovala u vzorků, kde jsem našla mutaci v *KRAS*. Za správný průběh qPCR jsem považovala výsledky amplifikací, u nichž bylo dosaženo hodnoty Ct od 15 do 30 cyklů. Příliš rychlý nárůst fluorescence (Ct hodnota nižší než 15 cyklů) se mi nepodařilo detekovat u žádného vzorku. Hodnota Ct vyšší než 30 cyklů

upozorňovala na příliš nízké množství templátové cDNA a byla detekována u 5 vzorků, u nichž nebyla naměřena RNA pomocí fluorometrie. U takto vysoké hodnoty Ct jsou výsledky nevěrohodné navzdory analýze disociační křivky. Naměřené hodnoty jsou prezentovány rovněž v orientační formě a nejsou statisticky zpracovány. Výsledkem, který by více vypovídal o hodnotách naměřených expresí, by byla vypočítaná relativní exprese dle navrženého vzorce, avšak to nebylo z výše zmíněných důvodů možné.

7 Souhrn

Optimalizovala jsem laboratorní postup pro kvantifikaci miRNA u vzorků získaných pomocí EUS-FNB za účelem zpřesnění diagnostiky a odhadu prognózy karcinomu pankreatu a splnila ostatní dílčí cíle této práce.

1. Pro optimalizaci izolace NK jsem pracovala se 4 komerčními soupravami a na základě vstupních a výstupních parametrů vybrala soupravu RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit.
2. Pro optimalizaci qRT-PCR jsem pracovala se 4 komerčními soupravami a na základě vstupních a výstupních parametrů pro qRT-PCR jsem vybrala nejvhodnější kombinaci souprav, tedy soupravy qScript microRNA cDNA Synthesis Kit a PerfeCTa microRNA Assay. Dále jsem upravila teplotní program pro qPCR a sledovala stabilitu cDNA, jejíž vlastnosti se výrazně nezměnily ani po 60 dnech uchovávání při teplotách 4 °C a -20 °C.
3. Průměrná účinnost primérů byla pro miR-10b, miR-21 a RNU6b vždy vyšší než 76 %. V rámci optimalizace qPCR, a také pro další analýzy vzorků, byla zjišťována specifita primérů, čímž byla také ověřena identita amplifikovaných produktů.
4. Ověřila jsem optimalizované laboratorní postupy pro izolaci NK na podskupině 110 vzorků a získala koncentraci NK vyšší než 0,05 ng·μl⁻¹ u 83 % vzorků RNA a 94 % vzorků DNA.
5. U všech 110 vzorků se mi podařilo analyzovat *KRAS* na DCE. Z tohoto počtu bylo 67 % na mutaci pozitivních. Na základě výsledků *KRAS* jsem vypočítala průměrné zastoupení mutovaných buněk a zjistila vysokou variabilitu získaných vzorků.
6. U vzorků s nalezenou mutací v *KRAS* jsem ověřila optimalizovaný laboratorní postup pro kvantifikaci RNU6b, miR-21 a miR-10b pomocí qRT-PCR. U všech testovaných vzorků byla zaznamenána hodnota Ct a amplifikace ověřena disociační křivkou. Funkčnost celého postupu jsem ověřila analýzou miR-21 u 100 % vzorků, analýzou RNU6b u 99 % vzorků a analýzou miR-10b u 93 % vzorků.
7. Navrhla a diskutovala jsem řešení pro kvantifikaci miRNA s ohledem na zastoupení nádorových buněk ve vzorku.

Podařilo se mi tedy vyvinout a ověřit účinný postup pro rutinní kvantifikaci miRNA z biotických vzorků tkáně pankreatu.

8 Přehled literatury

1. Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, *et al.* the transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity. *Oncogene* 2007; 26(49): 6979-6988.
2. Ali S, Saleh H, Sethi S, Sarkar FH, Philip PA. MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2012; 107: 1354-1360.
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-KRAS genes. *Cell* 1988; 53: 549-554.
4. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. a uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9: 277-279.
5. Applied Biosystems, Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays. Applied Biosystems 2010 [online]. [citováno 140202]. Dostupné z: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_044972.pdf]
6. Bakkevold RE, Arnesuo B, Kambestad B. Carcinoma of the pancreas and papilla of Vater: presenting symptoms, signs and diagnosis related to stage and tumor site. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 317-325.
7. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 13: 215-33.
8. Bauer AS, Keller A, Costello E, Greenhalf W, Bier M, Borries A, Beier M, Neoptolemos J, Buchler M, Werner J, Giese N, Hoheisel JD. Diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis by measurement of microRNA abundance in blood and tissue. *PLoS One* 2012; 7: e34151.
9. Benešová L. Využití moderních molekulárně-genetických metod v prevenci, časně diagnóze, predikci léčby a prognóze nádorových onemocnění. Dizertační práce, Univerzity Karlova v Praze, Praha 2007.
10. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-1908.
11. Bournet B, Pointreau A, Delpu Y, Selves J, Torrisani J, Buscail L, Cordelier P. Molecular endoscopic ultrasound for diagnosis of pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 2011; 3: 872-882.
12. Bournet B, Souque A, Senesse P, Assenat E, Barthet M, Lesavre N, Aubert A, O'Toole D, Hammel P, Levy P, Ruzsniowski P, Bouisson M, Escourrou J, Cordelier P, Buscail L. EUS-guided fine needle-aspiration biopsy coupled to KRAS mutation assay to differentiate pancreatic cancer from pseudo-tumorous chronic pancreatitis. *Endoscopy* 2009; 41: 552-557.
13. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
14. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ. a double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008; 68: 7846-7854.

15. Brand RE, Adai AT, Centeno BA, Lee LS, Rateb G, Vignesh S, Menard C, Wiechowska-Kozłowska A, Bołdys H, Hartleb M, Sanders MK, Munding JB, Tannapfel A, Hahn SA, Stefańczyk L, Tsongalis GJ, Whitcomb DC, Conwell DL, Morisset JA, Gardner TB, Gordon SR, Suriawinata AA, Lloyd MB, Wylie D, Labourier E, Andruss BF, Szafranska-Schwarzbach AE. a MicroRNA-Based Test Improves Endoscopic Ultrasound-Guided Cytologic Diagnosis of Pancreatic Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014 [před tiskem].
16. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 2008; 320: 1185-1190.
17. Brow DA, Guthrie C. Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature* 1988; 334: 213-218.
18. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T. a reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9(6): 582-589.
19. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2403–2413.
20. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-622.
21. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
22. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2171-2176.
23. Dobelbower RR, Merrick HW, Khuder S, Battle JA, Herron LM, Pawlicki T. Adjuvant radiation therapy for pancreatic cancer: a 15-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39: 31-37.
24. du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al ST, Souque A, Dufresne M, Tsongalis GJ, Suriawinata AA, Carrere N, Buscail L, Cordelier P. MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010; 56: 603-612.
25. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík j, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita 2005, [citováno 2013-7-25]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007]. ISSN 1802 – 8861.
26. Eloubeidi MA, Chen VK, Eltoun IA, Jhala D, Chhieng DC, Jhala N, Vickers SM, Wilcox CM. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy of patients with suspected pancreatic cancer: diagnostic accuracy and acute and 30-day complications. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2663-2668.
27. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 861-874.
28. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 2009; 15: 21-32.
29. Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 663-667.
30. Farhana L, Dawson MI, Murshed F, Das JK, Rishi AK, Fontana JA. Upregulation of miR-150* and miR-630 induces apoptosis in pancreatic cancer cells by targeting IGF-1R. *PLoS One* 2013; 8: e61015.

31. Fisher WE. Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg* 2001; 25: 503-508.
32. Frampton AE, Castellano L, Colombo T, Giovannetti E, Krell J, Jacob J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Funel N, Gall TM, De Giorgio A, Pinho FG, Fulci V, Britton DJ, Ahmad R, Habib NA, Coombes RC, Harding V, Knösel T, Stebbing J, Jiao LR. MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression. *Gastroenterology* 2014; 146: 268-277.
33. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepää AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev* 2009; 23:1313-326.
34. Ghadirian P, Lynch HT, Krewski D. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 87-93.
35. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, del CM, Erozcenci LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A, Danesi R, Campani D, Verheul HM, Boggi U. MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res* 2010; 70: 4528-4538.
36. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pebusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U s a* 2007; 104: 16170-16175.
37. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. the miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 593-601.
38. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol.* 2006; 342: 33-47.
39. Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer* 2010; 126: 73-80.
40. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 140-144.
41. Grosshans H, Chatterjee S. MicroRNAs and the regulated degradation of mature animal miRNAs. *Adv Exp Med Biol* 2010; 700: 140-155.
42. Guo S, Xu X, Tang Y, Zhang C, Li J, Ouyang Y, Ju J, Bie P, Wang H. miR-15a inhibits cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma by down-regulating Bmi-1 expression. *Cancer Lett* 2014; 344: 40-46.
43. Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, Offerhaus GJ, Ryu JK, Feldmann G, Mullendore ME, Goggins MG, Hong SM, Maitra A. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 340-346.
44. Hanoun N, Delpu Y, Suriawinata AA, Bournet B, Bureau C, Selves J, Tsongalis GJ, Dufresne M, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. the silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clin Chem* 2010; 56: 1107-1118.
45. Hansen TB, Kjems J, Bramsen JB. Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis. *RNA Biol* 2011; 8: 378-83

46. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-531.
47. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20: 1218-1249.
48. Hlavsa J, Man M, Kala Z, Procházka V, Svatoň R, Válek V, Vášová I, Novotný I, Stará K, Kiss I, Prášek J. Nádory pankreatu. *Med Pro Praxi* 2008; 5: 388-392.
49. Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 2010; 3: 109-113.
50. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett E, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJA. Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): a New nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 579-586.
51. Hu Y, Ou Y, Wu K, Chen Y, Sun W. miR-143 inhibits the metastasis of pancreatic cancer and an associated signaling pathway. *Tumour Biol* 2012; 33: 1863-1870.
52. Hutvagner G, Zamore PD. a microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-2060
53. Hwang JH, Voortman J, Giovannetti E, Steinberg SM, Leon LG, Kim YT, Funel N, Park JK, Kim MA, Kang GH, Kim SW, del CM, Peters GJ, Giaccone G. Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PLoS One* 2010; 5: e10630.
54. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26: 745-752.
55. Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Yu J, Kayashima T, Sakai H, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 3120-3128.
56. Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA. MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis, clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 534-545.
57. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer Statistics 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 5-26.
58. Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D, Fearon ER, Lawrence TS, Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 2009; 4: e6816.
59. Jiang XT, Tao HQ, Zou SC. Detection of serum tumor markers in the diagnosis and treatment of patients with pancreatic cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 464-468.
60. Jiao LR, Frampton AE, Jacob J, Pellegrino L, Krell J, Giamas G, Tsim N, Vlavianos P, Cohen P, Ahmad R, Keller A, Habib NA, Stebbing J, Castellano L. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One* 2012; 7: e32068.
61. Kawaguchi T, Komatsu s, Ichikawa D, Morimura R, Tsujiura M, Konishi H, Takeshita H, Nagata H, Arita T, Hirajima S, Shiozaki A, Ikoma H, Okamoto K, Ochiai T, Taniguchi H, Otsuji E. Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2013; 108: 361-369.

62. Kedde M, Strasser MJ, Boldajipour B, Oude Vrielink JA, Slanchev K, le Sage C, Nagel R, Voorhoeve PM, van Duijse J, Ørom UA, Lund AH, Perrakis A, Raz E, Agami R. RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell* 2007; 131: 1273-1286.
63. Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, Lopez-Romero P, Tan AC, Alvarez H, West K, Ochs MF, Hidalgo M, Arking DE, Maitra A, Mendell JT. a resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 2013-2024.
64. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-173.
65. Klöppel G, Adsay NV. Chronic pancreatitis and the differential diagnosis versus pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 382-387.
66. Kong X, Du Y, Wang G, Gao J, Gong Y, Li L, Zhang Z, Zhu J, Jing Q, Qin Y, Li Z. Detection of differentially expressed microRNAs in serum of pancreatic ductal adenocarcinoma patients: miR-196a could be a potential marker for poor prognosis. *Dig Dis Sci* 2011; 56: 602-609.
67. Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y. the miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 2008; 283: 14910-14914.
68. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. the widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 597-610.
69. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1046-1054.
70. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. the *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.
71. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23:4051-4060.
72. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
73. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115: 787-798.
74. Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, Borges M, Goggins M. Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels. *Cancer Res* 2010; 70: 5226-5237.
75. Li D, Jiao L. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer* 2003; 33: 3-14.
76. Li Y, Vandenboom TG, Wang Z, Kong D, Ali S, Philip PA, Sarkar FH. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 1486-1495.
77. Ling J, Kang Y, Zhao, Xia Q, Lee DF, Chang Z, Li J, Peng B, Fleming JB, Wang H, Liu J, Lemischka IR, Hung MC, Chiao PJ. *KRAS*(G12D)-Induced IKK2/ β /NF- κ B Activation by IL-1 α and p62 Feedforward Loops Is Required for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21: 105-120.
78. Liu A, Shao C, Jin G, Liu R, Hao J, Song B, *et al.* miR-208-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition of Pancreatic Cancer Cells Promotes Cell Metastasis and Invasion. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69: 341-346.
79. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2012; 131: 683-691.

80. Liu R, Chen X, Du Y, Yao W, Shen L, Wang C, Hu Z, Zhuang R, Ning G, Zhang C, Yuan Y, Li Z, Zen K, Ba Y, Zhang CY. Serum microRNA expression profile as a biomarker in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Clin Chem* 2012; 58: 610-618.
81. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 673-685.
82. Lu Y, Lu J, Li X, Zhu H, Fan X, Zhu S, Wang Y, Guo Q, Wang L, Huang Y, Zhu M, Wang Z. MiR-200a inhibits epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer stem cell. *BMC Cancer* 2014; 14: 85.
83. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006 ;71: 59-66.
84. MacKenzie TN, Mujumdar N, Banerjee S, Sangwan V, Sarver A, Vickers S, Subramanian S, Saluja AK. Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 1266-1275.
85. Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol Lett* 2010; 32: 1777-1788.
86. Miao L, Xiong X, Lin Y, Cheng Y, Lu J, Zhang J, Cheng N. miR-203 inhibits tumor cell migration and invasion via caveolin-1 in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett*. 2014; 7(3): 658-662.
87. Minárik M, Mináriková P. Molekulární genetika. In: Zavoral M, Bělina F, Fencel P, Ferkl M, Frič P, Koudová M, Lipská L, Macek M, Minárik M, Mináriková P, Novotný J, Petruželka L, Ryska M, Strnad R, Šálek C, Stehlík J, Visokai V, Závada F. *Karcinom pankreatu*. Galén, Praha 2005; 39-49. ISBN: 80-7262-348-6.
88. Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Nagata H, *et al*. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2011; 105: 1733-1740.
89. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* 2008; 18:610-621
90. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 223-229.
91. Nakata K, Ohuchida K, Mizumoto K, Kayashima T, Ikenaga N, Sakai H, Lin C, Fujita H, Otsuka T, Aishima S, Nagai E, Oda Y, Tanaka M. MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis. *Surgery* 2011; 150: 916-922.
92. Nana-Sinkam SP, Fabbri M, Croce CM. MicroRNAs in cancer: personalizing diagnosis and therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1210: 25-33.
93. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. a randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200-1210.
94. Ohuchida K, Mizumoto k , Kayashima T, Fujita H, Moriyama T, Ohtsuka T, Ueda J, Nagai E, Hashizume M , Tanaka M. MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 2381-2387.

95. Ohuchida K, Mizumoto k, Lin C, Yamaguchi H, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M. MicroRNA-10a is overexpressed in human pancreatic cancer and involved in its invasiveness partially via suppression of the HOXA1 gene. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2394-2402.
96. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222:540-545.
97. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008; 30: 460-71.
98. Papaconstantinou IG, Manta A, Gazouli M, Lyberopoulou A, Lykoudis PM, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance. *Pancreas* 2013; 42: 67-71.
99. Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, *et al.* miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406: 518-523.
100. Park JK, Lee EJ, Esau C, Schmittgen TD. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2009; 38: e190-e199.
101. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. the miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008; 22: 894-907.
102. Pratt AJ, MacRae IJ. the RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 2009; 284:17897-17901.
103. Preis M, Gardner TB, Gordon SR, Pipas JM, Mackenzie TA, Klein EE, Longnecker DS, Gutmann EJ, Sempere LF, Korc M. MicroRNA-10b expression correlates with response to neoadjuvant therapy and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5812-5821.
104. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8: 23-36.
105. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, Oren M. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26: 731-743.
106. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. the 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-906.
107. Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG, Maitra A. Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatol* 2010; 10: 66-73.
108. Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3714-3720.
109. Salek C, Minarikova P, Benesova L, Nosek V, Strnad R, Zavoral M, Minarik M. Mutation status of K-ras, p53 and allelic losses at 9p and 18q are not prognostic markers in patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 1803-1810.
110. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J, Grosclaude P, Hédelin G, Matsuda T, Møller H, Möller T, Verdecchia A, Capocaccia R, Gatta G, Micheli A, Santaquilani M, Roazzi P, Lisi D. EURO CARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol* 2003; 14: 61-118.

111. Schultz NA, Andersen KK, Roslind A, Willenbrock H, Wojdemann M, Johansen JS. Prognostic microRNAs in cancer tissue from patients operated for pancreatic cancer--five microRNAs in a prognostic index. *World J Surg* 2012a; 36: 2699-2707.
112. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, Wojdemann M, Johansen JS. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2012b; 25: 1609-1622.
113. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 2005;39: 519-525.
114. Slabý O, Svoboda M, Bešše A, Bienertová-Vašků J, Černá K, Doležalová D, Dostálová Merkerová M, Ehrmann J, Fajtejsková P, Hájek R, Hájková H, Juráček J, Krejčík Z, Kubiczková L, Kulda V, Lakomá R, Lužná P, Machová Poláková K, Mayer J, Mayerová V, Mráz M, Musilová K, Pešta M, Poprach A, Pospíšilová Š, Rádová M, Šána J, Ševčíková S, Štěrba J, Votavová H, Vyzula R, Srovnal J. *MiRNA v onkologii*. Galén, Praha 2012; 324 stran. ISBN 97-8807-262-5871
115. Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, Cordelier P. Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther* 2013; 21: 986-994.
116. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11-30.
117. Singh S, Chitkara D, Kumar V, Behrman SW, Mahato RI. miRNA profiling in pancreatic cancer and restoration of chemosensitivity. *Cancer Lett* 2013; 334: 211-220.
118. Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, Neoptolemos JP, Greenhalf W, Bartsch DK. PALB2 mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet* 2010; 78: 490-494.
119. Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, *et al.* the transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 2008; 68(2): 537-544.
120. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 4442-4452.
121. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttges J, Munding JB, Barth RJ, Jr., Gutmann EJ, Suriawinata AA, Marc PJ, Tannapfel A, Korc M, Hahn SA, Labourier E, Tsongalis GJ. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 2008; 54: 1716-1724.
122. Šálek C. Epidemiologie a rizikové faktory. In: Zavoral M, Bělina F, Fencel P, Ferkl M, Frič P, Koudová M, Lipská L, Macek M, Minárik M, Mináriková P, Novotný J, Petruželka L, Ryska M, Strnad R, Šálek C, Stehlík J, Visokai V, Závada F. *Karcinom pankreatu*. Galén, Praha 2005; 21-35. ISBN: 80-7262-348-6
123. Tada M., Komatsu Y., Kawabe T., Sasahira N., Isayama H., Toda N., Shiratori Y., Omata M. Quantitative analysis of K-ras gene mutation in pancreatic tissue obtained by endoscopic ultrasonography-guided fine needle aspiration: clinical utility for diagnosis of pancreatic tumor. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2263-2270
124. Takahashi K, Yamao K, Okubo K, Sawaki A, Mizuno N, Ashida R, Koshikawa T, Ueyama Y, Kasugai K, Hase S, Kakumu S. Differential diagnosis of pancreatic cancer and focal pancreatitis by using EUS-guided FNA. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 76-79.
125. Tassi E, Wellstein A. the angiogenic switch molecule, secreted FGF-binding protein, an indicator of early stages of pancreatic and colorectal adenocarcinoma. *Semin Oncol* 2006; 33: 50-56.

126. Torrisani J, Bournet B, Du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, *et al.* let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 2009; 20:831–44.
127. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007; 316: 575-579.
128. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, *et al.* SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(20): 6566-6578.
129. Wang J, Chen J, Chang P, LeBlanc A, Li D, Abbruzzesse JL, Frazier ML, Killary AM, Sen S. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2: 807-813.
130. Wang P, Chen L, Zhang J, Chen H, Fan J, Wang K, Luo J, Chen Z, Meng Z, Liu L. Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 2014; 33: 514-524.
131. Weiss FU, Marques IJ, Woltering JM, Vlecken DH, Aghdassi A, Partecke LI, Heidecke CD, Lerch MM, Bagowski CP. Retinoic acid receptor antagonists inhibit miR-10a expression and block metastatic behavior of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2009; 137: 2136-2145.
132. Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 2009; 11(12): 1487-1495.
133. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855-862.
134. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11:228-234.
135. Wu K, Hu G, He X, Zhou P, Li J, He B, Sun W. MicroRNA-424-5p Suppresses the Expression of SOCS6 in Pancreatic Cancer. *Pathol Oncol Res* 2013; 19: 739-748.
136. Xu D, Wang Q, an Y, Xu L. MiR203 regulates the proliferation, apoptosis and cell cycle progression of pancreatic cancer cells by targeting Survivin. *Mol Med Rep* 2013; 8: 379-384.
137. Xue Y, Abou Tayoun AN, Abo KM, Pipas JM, Gordon SR, Gardner TB, Barth RJ, Jr., Suriawinata AA, Tsongalis GJ. MicroRNAs as diagnostic markers for pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor, pancreatic intraepithelial neoplasm . *Cancer Genet* 2013; 206: 217-221.
138. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 981-992.
139. Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, Sato N, Kayashima T, Fujita H, Nakata K, Tanaka M. MicroRNA, hsa miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol Cancer* 2010; 9: 169.
140. Zavoral M. Klinický obraz a diagnostika. In: Zavoral M, Bělina F, Fencel P, Ferkl M, Frič P, Koudová M, Lipská L, Macek M, Minárik M, Mináriková P, Novotný J, Petruželka L, Ryska M, Strnad R, Šálek C, Stehlík J, Visokai V, Závada F. *Karcinom pankreatu*. Galén, Praha 2005; 99-134. ISBN: 80-7262-348-6
141. Zhao C, Zhang J, Zhang S, Yu D, Chen Y, Liu Q, Shi M, Ni C, Zhu M. Diagnostic and biological significance of microRNA-192 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2013; 30: 276-284.

142. Zhu Z, Xu Y, Du J, Tan J, Jiao H. Expression of microRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its correlation with tumor progression and patient survival. *J Surg Oncol* 2014; 109(2): 89-94.

Abstrakt k posteru ze XVII. celostátní konference DNA diagnostiky

Optimalizace postupů pro kvantifikaci prognostických a diagnostických miRNA u karcinomu pankreatu ze vzorků získaných metodou EUS-FNA

R. Čuperková¹, B. Belšánová¹, L. Benešová¹, B. Bunganič², T. Dvořáková², M. Zavoral², M.Minárik¹

¹ Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac výzkumný ústav, Praha

² Interní klinika, Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Karcinom pankreatu (CP) je velmi závažné onemocnění s většinou infaustní prognózou (průměrné 5-leté přežití < 5%), vysokou mortalitou a zvyšující se incidencí v populaci. v současné době neexistuje žádný spolehlivý nástroj ani marker, který by s dostatečnou specifitou a citlivostí diagnostikoval toto onemocnění v jeho časných stádiích. Pacienti s CP v době diagnózy tak bývají často ve špatném zdravotním stavu a léčba nemívá výrazný účinek. Z těchto důvodů se klade stále větší důraz na nalezení vhodných molekulárních markerů, a to zejména pro zlepšení diagnózy a odhad prognózy. Jedním z takových markerů jsou mikroRNA, 21-23 nt dlouhé jednořetězcové nekódující RNA, potencionálně využitelné jak v diagnostice a ke stanovení prognózy, tak i ke sledování průběhu onemocnění, predikci odpovědi na léčbu nebo návrhu nových léčebných terapií. Vzhledem k tomu, že je jen málo pacientů indikováno k operaci, odběr vzorků pro následná vyšetření se provádí biopsií tenkou jehlou pod kontrolou endoskopické ultrasonografie (EUS-FNA) a to za účelem potvrzení CP nebo stanovení diagnózy chronická pankreatitida. Běžně jsou tyto vzorky zpracovávány pouze jako cytologické preparáty, ale složitější molekulárně-genetická vyšetření, jako je stanovení hladin miRNA, vyžadují větší množství tkáně. Odběr takového vzorku se v rutinní praxi neprovádí a vyžaduje kromě zručnosti a zkušenosti lékaře také volbu vhodné bioptické jehly a techniky odběru. Navíc úspěšnost molekulárních vyšetření pankreatické tkáně bývá nižší v porovnání s ostatními tkáněmi a tak správná volba postupu izolace nukleových kyselin (NK) a následných analýz včetně použitých kitů je klíčová.

Cílem této práce bylo zoptimalizovat celý postup od odběru vzorků, přes izolaci NK a syntézu cDNA až po analýzu mutací genu *KRAS* a hladin vybraných miRNA ze vzorků tkáně pankreatu získaných pomocí EUS-FNA za účelem nalezení prognostických a diagnostických miRNA. Výsledky molekulárně genetických analýz (výtěžky qPCR a PCR a zastoupení mutované DNA) u 65 vzorků nádorové či zánětlivé tkáně pankreatu byly korelovány s parametry odběru (typ jehly, technika, velikost vzorku, příměs krve, lokalizace a velikost nádoru) a způsobem extrakce NK a přípravou cDNA (různé komerční kity). Následně byl stanoven optimální postup a na podskupině deseti vzorků bylo provedeno stanovení hladin vybraných miRNA s potencionálně prognostickým a diagnostickým významem.